

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
katedra buněčné biologie
Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie
Diplomní zaměření: Vývojová biologie



Bc. Adéla Hlavatá

Studium biologické funkce nádorového supresoru *HIC1*
Biological mechanisms of function of the *HIC1* tumor suppressor

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.04.2013

Podpis

Poděkování:

Děkuji svému školiči RNDr. Vladimíru Kořínkovi, CSc. za jeho odbornou intervenci a pochopení a Vendule Pospíchalové, PhD. za báječnou spolupráci, účast a přátelství.

Obsah

Souhrn	5
Abstract.....	6
Seznam použitých anglických zkratk	7
Úvod.....	9
Cíle práce	10
Teoretický úvod	11
<i>Hypermethylated In Cancer 1</i> , nový nádorový supresorový gen	11
Epigenetická regulace a její vliv na rozvoj rakoviny	11
Nádorový supresor <i>HIC1</i>	11
Struktura genu <i>HIC1</i>	12
Protein HIC1	13
<i>Hic1</i> v kontextu organismu.....	15
Cílové geny HIC1.....	15
<i>Hic1</i> a fenotyp myších mutantů při jeho ztrátě a umlčení	15
Cre- <i>loxP</i> systém a podmíněná delece <i>Hic1 in vivo</i>	16
Regulace proteinu HIC1 a odpověď na poškození DNA	18
Kanonická signální dráha Wnt.....	19
Střevní výstelka	22
Organizace a dynamika sebeobnovy střevní výstelky	22
Typy buněk ve střevní výstelce a jejich regulace	23
Studium střevní výstelky <i>in vitro</i>	24
Materiál a metody	27
Použité myši kmeny a podmíněná delece genu <i>Hic1 in vivo</i>	27
Expresní čipová analýza a podmíněná delece genu <i>Hic1 in vitro</i>	27
Genotypování	28
Histologie a imunohistochemické barvení střevní tkáně po ztrátě genu <i>Hic1</i>	29
Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase	30
Izolace střevních krypt pro qPCR	32
Kultivace střevních epitelálních organoidů.....	32
Proliferační analýza a fluorescenční barvení organoidů	35
Výsledky	37
Hledání nových cílových genů <i>Hic1</i>	37
Studium biologické funkce <i>Hic1 in vitro</i>	37

Cílové geny <i>Hic1</i> <i>in vivo</i>	40
Studium funkce <i>Hic1</i> ve střevních epiteliálních organoidech	41
<i>Hic1</i> ovlivňuje proliferaci buněk střevního epitelu	42
<i>Hic1</i> ovlivňuje množství Panethových buněk ve střevním epitelu	42
Vliv ztráty genu <i>Hic1</i> na buněčné složení střevního epitelu	43
<i>Hic1</i> ovlivňuje množství pohárkových a enteroendokrinních buněk ve střevním epitelu	44
Diskuze	45
Závěr.....	48
Literatura.....	49

Souhrn

Nádorový supresorový gen *HIC1* kóduje transkripční represor z rodiny BTB/POZ. Ve velkém množství nádorů bývá často umlčován hypermetylací svého promotoru. *HIC1* je také negativním modulátorem kanonické signální dráhy Wnt, jež se významně podílí na regulaci sebeobnovy kmenových buněk střevní výstelky. Střevní výstelka je díky své stavbě vhodnou modelovou tkání pro výzkum kmenových buněk a jejich patologie. Protože kompletní „knock-out“ myšího genu *Hic1* je embryonálně letální, byla biologická funkce tohoto genu zkoumána pomocí podmíněné delece v dospělosti. Expresní čipovou analýzou myších embryonálních fibroblastů jsme zjistili řadu nových cílových genů *Hic1*, z nichž nejzajímavějším v souvislosti s rakovinou jsme shledali gen *Toll-like receptor 2*. Na regulaci exprese těchto cílových genů má pravděpodobně vliv i p53, ačkoliv přímé působení nebylo potvrzeno. *Hic1* ovlivňuje zastoupení typů diferencovaných buněk ve střevním epitelu pomocí regulace *Atoh1*. Po vyřazení *Hic1* ve střevním epitelu jsme pozorovali a kvantitativně potvrdili zvýšené množství pohárkových buněk. Ovlivnění dráhy diferenciac epitelálních buněk může být jedním ze způsobů, kterým *Hic1* plní i funkci potlačování nádorů.

Klíčová slova: *HIC1*, *Hypermethylated In Cancer 1*, genové manipulace, nádory, expresní profilování mRNA, buněčné signalizace, střevní epitel, organoidy

Abstract

The tumor suppressor gene *HIC1* encodes a BTB/POZ transcription repressor. Its promotor is frequently hypermethylated in large numbers of tumors. HIC1 also functions as a negative modulator of the Wnt signalling pathway, which fundamentally participates in regulation of stem cell renewal of the intestinal epithelium. Thanks to its structural features the intestinal epithelium represents a convenient model tissue to study stem cells and their pathology. To overcome the embryonic lethality of the complete *Hic1* “knock-out“ the conditional deletion of the gene in adult mouse tissue was chosen to evaluate the *Hic1* biological activity. By the chip expression analysis of mouse embryonic fibroblasts we discovered a number of new target genes of *Hic1*, the most interesting of them - in respect to cancer - we considered the *Toll-like receptor 2* gene. The expression of *Hic1* target genes is likely to be co-regulated by p53 although the direct regulation wasn't proved. Hic1 affects the proportion of the differentiated intestinal epithelial cells types possibly via regulation of *Atoh1*. After conditional deletion of *Hic1* in the intestinal epithelium we observed and quantitatively confirmed a significant increase of the amounts of goblet cells. We concluded that *Hic1* affects differentiation pathways in intestinal epithelium and by this means it can influence its tumor suppressor role in the intestine.

Keywords: *HIC1*, *Hypermethylated In Cancer 1*, gene targeting, tumors, expression profiling, cellular signaling, intestinal epithelium, organoids

Seznam použitých anglických zkratek

<i>Actb</i>	<i>β-Actin</i>
<i>ADRB2</i>	<i>B-2 Adrenergic Receptor</i>
<i>Angptl7</i>	<i>Angiopoietin-Like Protein 7</i>
<i>APC</i>	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
<i>ATOH1</i>	<i>Atonal Homolog 1</i>
<i>Bmi1</i>	<i>B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1 Homolog</i>
<i>BTB/POZ</i>	<i>Broad complex, Tramtrack, Brick à brac/ Pox viruses and Zinc finger</i>
<i>Cbr2</i>	<i>Carbonyl Reductase 2</i>
<i>CCND1</i>	<i>Cyclin D1</i>
<i>CDKN1C</i>	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1C</i>
<i>Cre</i>	<i>Cyclization Recombination</i>
<i>CtBP</i>	<i>C-terminal Binding Protein</i>
<i>CXCR7</i>	<i>Scavenger Chemokine Receptor 7</i>
<i>Dapk2</i>	<i>Death-Associated Protein Kinase 2</i>
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>E2F1</i>	<i>E2F Transcription Factor 1</i>
<i>EDTA</i>	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<i>Efnal</i>	<i>Ephrin A1</i>
<i>EGF</i>	<i>Epithelial Growth Factor</i>
<i>EGTA</i>	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
<i>ERE</i>	<i>E2F1 Responsive Element</i>
<i>FBS</i>	<i>fetal bovine serum</i>
<i>FGF-BP1</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1</i>
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
<i>Gfi1</i>	<i>Growth Factor Independent 1</i>
<i>HDAC4</i>	<i>Histone Deacetylase 4</i>
<i>HES-1</i>	<i>Hairy/Enhancer of Split 1</i>
<i>HIC1</i>	<i>Hypermethylated In Cancer 1</i>
<i>HiRE</i>	<i>HIC1 Responsive Element</i>
<i>Hsp90</i>	<i>Heat Shock Protein 90</i>
<i>Hspb6</i>	<i>Heat Shock Protein b-6</i>
<i>LEF</i>	<i>Lymphoid Enhancer Factor</i>
<i>Lgr5</i>	<i>Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein Coupled Receptor 5</i>
<i>Lis1</i>	<i>Lisencephaly 1</i>
<i>loxP</i>	<i>Locus Of X-over P1</i>
<i>LRP</i>	<i>LDL-Related Protein</i>
<i>MEFs</i>	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
<i>Neurog3</i>	<i>Neurogenin 3</i>
<i>Olfm4</i>	<i>Olfactomedin 4</i>
<i>P53-RE</i>	<i>p53-Responsive Element</i>

PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCP	planar cell polarity
<i>SI</i>	<i>sucrase-isomaltase</i>
<i>SIRT1</i>	<i>Sirtuin 1</i>
<i>SOX9</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
<i>SUMO</i>	<i>Small Ubiquitin Related Modifier</i>
TBS	Tris-buffered saline
<i>TCF</i>	<i>T-Cell Factor</i>
<i>Tlr2</i>	<i>Toll-like receptor 2</i>
<i>Tmco1</i>	<i>Transmembrane and Coiled-Coil Domains 1</i>
<i>TP53</i>	<i>Tumor Protein p53</i>
<i>Ubb</i>	<i>Ubiquitin B</i>
<i>Wfdc2</i>	<i>WAP Four-Disulfide Core Domain 2</i>

Úvod

Na světě existuje obrovské množství velmi nebezpečných onemocnění, která měla za lidskou éru na svědomí vymírání celých populací. Další mají obdobné důsledky bohužel i v dnešní době, ale žádná z nemocí nebudí v rozvinuté civilizaci u laické veřejnosti takový respekt, jako rakovina. Protože rakovina, to je rána pod pás, která přichází z vlastních řad. Přestože se cítíme víceméně dobře chráněni proti útoku z vnějšku, se zradou buněk svého těla nikdo nepočítá, proto je tato hrozba u lidí vnímána s naléhavostí, která jí skutečně přísluší.

Ačkoli v posledních desetiletích došlo k zásadnímu pokroku na poli výzkumu principů fungování různých druhů rakoviny, je očividné, že různorodost a složitost nádorových onemocnění je zatím značně v předstihu před lidskou snahou o jejich léčbu.

Příslušníci našeho národa nepopíratelně disponují několika unikátními světově proslulými vlastnostmi a dovednostmi, avšak existuje i černá skvrna na naší pověsti, a to v podobě držby celosvětového primátu ve frekvenci výskytu nádoru tlustého střeva a konečníku. Právě tento typ karcinomu patří vzhledem ke svým pozdním symptomům a lokalizaci k jednomu z nejzákeřnějších rakovinných onemocnění vůbec.

V diplomové práci jsem se pokusila rozklíčovat jednu „kapku z moře“ biologických mechanismů s vazbou na výše zmíněný typ rakoviny.

Cíle práce

- Určit nové cílové geny nádorového supresorového genu *Hic1* na základě experimentu *in vitro*, z nich vybrat vhodné kandidátní geny pro další výzkum v souvislosti s nádory a ověřit správnost získaných údajů v *in vivo* systému na myším modelu.
- Provéřit součinnost vlivu Hic1 a p53 na cílové geny Hic1, která nastává při současné cílené inaktivaci *Hic1* a *TP53* *in vitro*.
- Analyzovat fenotyp vzniklý cílenou inaktivací *Hic1* ve střevním epitelu a ověřit vliv *Hic1* na zastoupení jednotlivých typů diferencovaných buněk ve střevním epitelu.
- Připravit dlouhodobě udržitelnou tkáňovou kulturu střevních epiteliálních organoidů a na tomto modelu sledovat vliv *Hic1* na buněčnou proliferaci.

Teoretický úvod

Hypermethylated In Cancer 1, nový nádorový supresorový gen

Epigenetická regulace a její vliv na rozvoj rakoviny

Vznik a rozvoj nádoru může být ovlivněn jak změnami genetickými, jež mají vliv přímo na sekvenci DNA, tak změnami epigenetickými, které zahrnují všechny ostatní modifikace, které přímo nazasahují strukturu genomu. Epigenetické vlivy, jako je metylace DNA, modifikace histonů nebo produkce microRNA mají mnohdy klíčový vliv na směr, kterým se bude buňka ubírat. Proto může deregulace epigenetických procesů ovlivňujících genovou expresi způsobit velké množství patologických stavů buňky včetně nádorové transformace (Kanwal and Gupta, 2012). Jedním z nejlépe popsáných mechanismů epigenetických změn je právě metylace DNA a s ní spojené „umlčení“ genu na tzv. dinukleotidových CpG ostrůvcích (Denis et al., 2011).

Exprese téměř 90 % lidských genů je závislá na promotorech obsahujících oblasti bohaté na cytosin a guanin (Futreal et al., 2004). Přestože epigenetické změny mohou nastat kdykoli během kancerogeneze, ve většině případů se tyto události vyskytují během raných stádií vzniku nádoru. Modifikace zpravidla nasměrují buňky k dalším abnormalitám, vzniku prekancerózních lézí a následně i rakoviny, tj. agresivní neoplázie, která poškozuje své okolí a zakládá nová ložiska - metastázy (Arai and Kanai, 2010).

Nádorový supresor *HIC1*

Gen *HIC1* (*Hypermethylated In Cancer 1*) kóduje evolučně vysoce konzervovaný transkripční represor. Oblast 17. chromozomu zahrnující *HIC1* podléhá hypermetylaci, výjimečně i delecii, a to ve velkém množství různých typů nádorů lidských tkání, např. tlustého střeva (Pehlivan et al., 2010), prostaty (Kilinc et al., 2012), prsu (Parrella et al., 2005), krevetvorných buněk (Britschgi et al., 2008) a mnoha dalších zhoubných onemocnění (Fleuriel et al., 2009). Ve zdravých tkáních je naopak neustále udržována určitá hladina exprese genu *HIC1* (Grimm et al., 1999; Pospichalova et al., 2011).

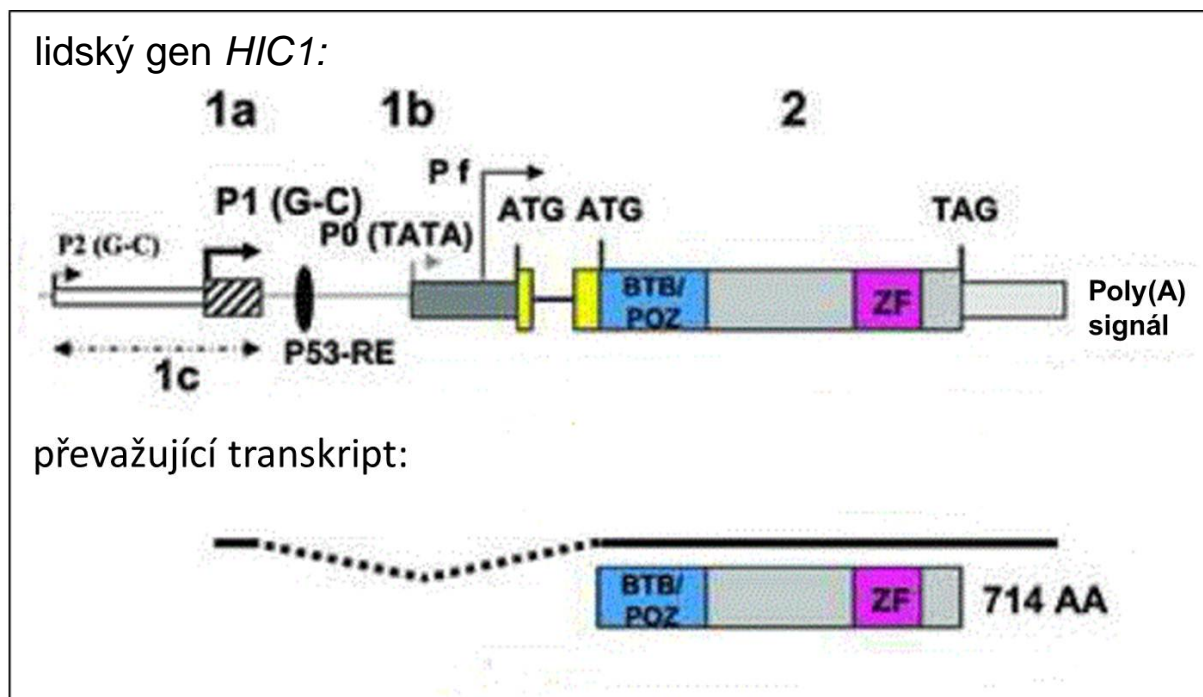
Historie výzkumu *HIC1* je od začátku propojena s genem *TP53* (*Tumor Protein p53*), protože oba geny jsou kódovány krátkým „raménkem“ 17. chromozomu, jehož mutace či ztráta je patrně jednou z nejčastějších událostí přispívajících ke vzniku nejrozličnějších typů nádorů (Sidransky and Hollstein, 1996).

Nieméně u některých nádorových buněk dochází ke ztrátě pouze té části 17. chromozomu, která leží telomericky od *TP53*, a samotný gen *TP53* tedy zůstává nepoškozen (Cornelis et al., 1994). Toto zjištění následně vedlo ke zkoumání přilehlé chromozomální oblasti často podléhající metylaci a objevu a charakterizaci nového nádorového supresoru *HIC1* (Wales et al., 1995).

HIC1 je s genem *TP53* spjat nejen obdobnou lokalizací, ale i funkčně, jak vyplývá ze studií fenotypů různých kombinací (cis a trans) mutovaných alel těchto genů. Dvojitě heterozygotní myš v „cis“ uspořádání (*Hic1*^{+/-}*TP53*^{+/-} delece jsou na stejném chromozomu) vyvine široké spektrum nádorů, a to dříve a agresivnějších než myš, která je stejného genotypu, ale v uspořádání „trans“ (delece jsou každá na jednom chromozomu). V případě „cis“ nádorů je delece zbývajících zdravých alel způsobena ztrátou celého raménka chromozomu, u „trans“ nádorů je zdravá alela *Hic1* hypermetylována, zatímco druhá alela *TP53* podlehlá náhodné delecí (Chen et al., 2004).

Struktura genu *HIC1*

Struktura lidského a myšího genu *HIC1* je velmi podobná. Celková délka je přibližně 5000 nukleotidů. První exon má tři alternativy, protože jeho přepis může probíhat ze tří různých promotorů, P0, P1 a P2 (obr. 1). Exprese dvou z těchto variant (exon 1a a 1b) podléhá regulaci proteinem p53 a dalšími členy rodiny p53 (hlavně TAp73β a ΔNp63α),



Obrázek 1 Struktura lidského lokusu *HIC1*;
upraveno z (Fleuriel et al., 2009).

a to prostřednictvím regulační oblasti P53-RE (*p53-Responsive Element*) (Britschgi et al., 2006). Exony 1a a 1c jsou nekódující a jsou asociovány s promotory obsahujícími oblasti bohaté na nukleotidy G-C (P1, P2). Exon 1b je kódující, jeho přepis je zahajován z promotoru P0, který obsahuje TATA box.

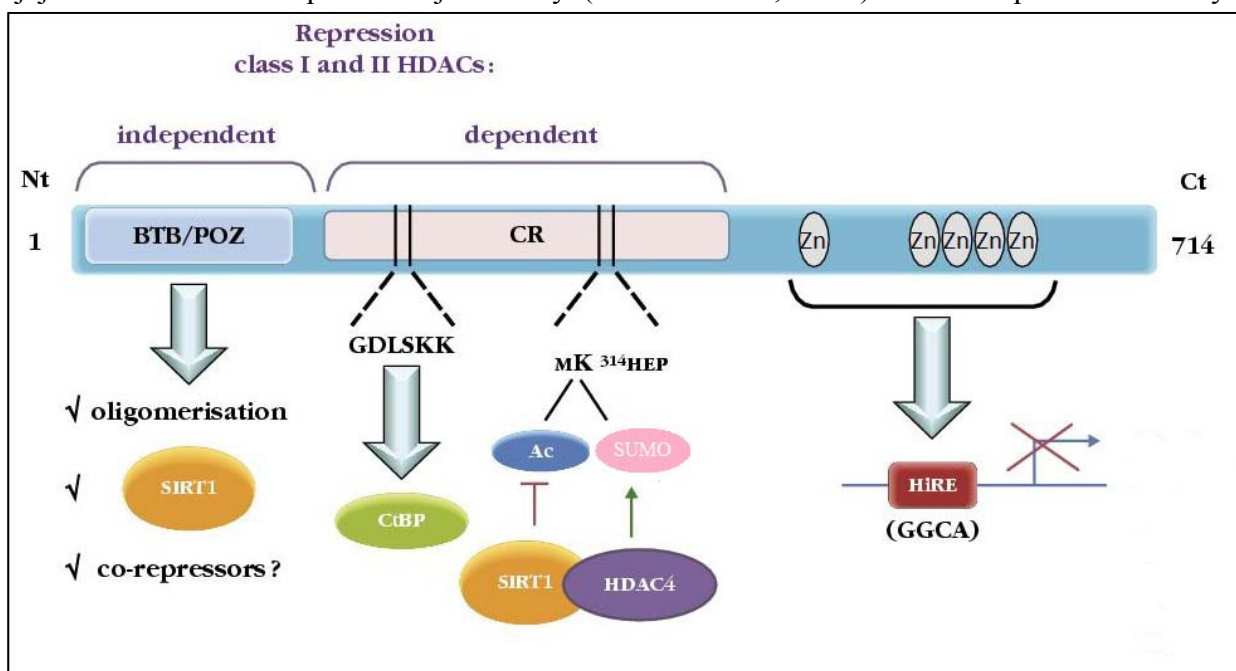
Druhý exon má pouze jednu variantu, obsahuje hlavní kódující část genu a 3' nepřekládanou oblast (Carter et al., 2000). Ve výsledku může vzniknout šest různých prepisových variant *HIC1*, přičemž jednoznačně nejčastější je přepis z promotoru P1. Gen *HIC1* obsahuje celkově velké množství nukleotidů G-C, navíc všechny tři promotory jsou obklopeny CpG ostrůvky, proto je *HIC1* ideálním cílem pro inaktivaci transkripce pomocí metylace DNA (Rood et al., 2002).

V myším genomu se *Hic1* nachází na 11. chromozomu a tvoří sestřihové formy velmi podobné lidským variantám *HIC1* (Chen et al., 2004).

Protein HIC1

Po překladu transkriptu *Hic1 1a* vzniká evolučně vysoce konzervovaný protein dlouhý 714 aminokyselin, který přísluší k rodině transkripčních faktorů BTB/POZ (Broad complex, Tramtrack, Brick à brac/ Pox viruses and Zinc finger) (Fleuriel et al., 2009) (obr. 2). Za N-koncovou doménou, typickou pro tuto rodinu, následuje centrální část a C-koncová DNA vazebná doména složená z pěti zinkových „prstů“ (Krüppel-like Cys₂-His₂ motiv).

Doména BTB/POZ a centrální oblast tvoří dvě na sobě nezávislé represivní domény, jejichž mechanismus působení je odlišný (Deltour et al., 1999). Zatímco pomocí domény



Obrázek 2 Stavba proteinu HIC1 a funkce jednotlivých strukturních prvků; upraveno z (Dehennaut and Leprince, 2009).

BTB/POZ interaguje HIC1 s deacetylázou histonů III. třídy SIRT1 (Sirtuin 1), centrální oblast obsahuje aminokyselinový motiv GDLSKK, který je zodpovědný za vazbu s proteinem CtBP (C-terminal binding protein) (Fleuriel et al., 2009). C-koncová DNA vazebná doména se pomocí zinkových prstů váže na DNA do specifického sekvenčního motivu zvaného *HiRE* (*HIC1 Responsive Element*) (Pinte et al., 2004). V centrální části proteinu se nachází MKHEP oblast (název odráží sekvenci aminokyselin), umožňující acetylaci či modifikaci proteinem SUMO (Small Ubiquitin Related Modifier), což má výrazný vliv na represivní potenciál HIC1. V případě modifikace proteinem SUMO na lysinu 314 je represivní aktivita HIC1 umocněna, naopak acetylace téhož lysinu represivní funkci potlačuje. K regulaci acetylace/sumoylace dochází pomocí souhry deacetyláz histonů SIRT1 a HDAC4 (Histone Deacetylase 4) (Stankovic-Valentin et al., 2007).

N-koncová doména BTB/POZ zajišťuje oligomerizaci HIC1. Tato vzájemná interakce jednotlivých molekul HIC1 umožňuje transkripční represi cílových genů nezávisle na činnosti deacetyláz histonů. Jedná se o tzv. nepřímou represi, při níž HIC1 negativně reguluje přepis genů, jejichž promotory neobsahují *HiRE*. Příkladem tohoto působení je interakce HIC1 s TCF-4 (T-cell-specific Transcription Factor 4, alternativní název genu je *TCF7L2*) a β -kateninem za tvorby jaderných komplexů, díky nimž je snížena hladina exprese cílových genů signální dráhy Wnt (Valenta et al., 2006).

***Hic1* v kontextu organismu**

Cílové geny HIC1

V současné době je známo pouze jedenáct přímých cílových genů HIC1, tzn. genů, které obsahují ve svém promotoru HiRE. Tato skupina je co se týče buněčné funkce velmi různorodá (Pinte et al., 2004).

SIRT1 (Sirtuin 1) je deacetyláza histonů typu III podílející se mimo jiné na regulaci stresových odpovědí buňky kontrolovaných proteinem p53 (Tseng et al., 2009).

CCND1 (Cyclin D1) a **CDKN1C** (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1C) jsou proteiny regulující buněčný cyklus (Van Rechem et al., 2010).

ATOH1 (Atonal Homolog 1) je nezbytným faktorem pro diferenciaci sekretorních typů buněk střevního epitelu a buněk nervového systému (Briggs et al., 2008; VanDussen and Samuelson, 2010).

SOX9 (SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9) se podílí např. na diferenciaci kmenových buněk střevního epitelu (Mohammad et al., 2011).

E2F1 (E2F Transcription Factor 1) působí jako principiální regulátor buněčného cyklu (Zhang et al., 2009).

CXCR7 (Scavenger Chemokine Receptor 7) jehož patologická exprese podporuje rozvoj metastáz rakoviny prsu (Van Rechem et al., 2009).

FGF-BP1 (Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1) přispívá k proliferaci buněk cévního endotelu a hladké svaloviny (Briones et al., 2006).

ADRB2 (β -2 Adrenergic Receptor) má vliv na srdeční činnost a hraje roli v některých typech rakoviny (Boulay et al., 2012).

EPHA2 (Ephrin type-A receptor 2) a **EFNA1** (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 1) jejichž deregulace působí vznik epiteliálních nádorů (Foveau et al., 2012; Zhang et al., 2010).

***Hic1* a fenotyp myších mutantů při jeho ztrátě a umlčení**

Myši, které mají funkční pouze jednu alelu *Hic1* (*Hic1*^{+/-}), vyvíjejí velké množství různých maligních nádorů, jejichž spektrum závisí na věku a pohlaví postižených jedinců. U samců je jasně pozorovatelný sklon k rozvoji karcinomů (75 % případů) a u samic dochází převážně ke vzniku lymfomů a sarkomů (u celkem 80 % případů). Analýzy nemocných zvířat ukázaly, že nepoškozená alela *Hic1* byla v nádorových tkáních hypermetylvána na CpG

„ostrůvcích“ promotoru, tudíž byla transkripce *Hic1* zablokována. Ačkoliv studovaní jedinci byli vždy genotypu *Hic1*^{+/+}, vznikající nádory byly vždy bez *Hic1* (*Hic1*^{-/-}) (Chen et al., 2003).

U lidských pacientů trpících nádory s umlčenou expresí *HIC1* však nepozorujeme rozdíl v četnosti a typech nádorů v závislosti na pohlaví (Stöcklein et al., 2008). Lidé, kteří se narodí pouze s jednou funkční alelou *HIC1* (*HIC1*^{+/+}) trpí Miller-Diekerovým syndromem, závažnou formou lisencephalie (agyrie) doprovázenou anomáliemi v mozkové i obličejové části hlavy a silnou duševní zaostalostí. Takto postižení jedinci se zpravidla nedožívají ani školního věku. Gen pro *HIC1* je u těchto pacientů inaktivován rozsáhlou delecí v oblasti 17. chromozomu (Grimm et al., 1999), zahrnující např. gen *LIS1*.

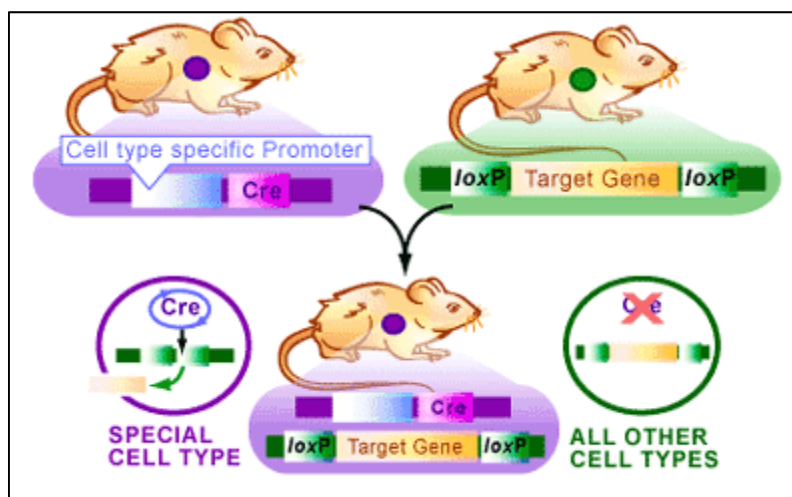
Myši, kterým gen *Hic1* úplně chybí (*Hic1*^{-/-}), se rodí mrtvé a vykazují mnoho vývojových defektů. Mimo jiné i takových, kterými jsou postižení lidé trpící Miller-Diekerovým syndromem (Carter et al., 2000; Pospichalova et al., 2011; Yingling et al., 2003).

Cre-loxP systém a podmíněná delece *Hic1* *in vivo*

Aby bylo možné studovat roli *Hic1* u myši, bylo nutné vytvořit model podmíněné delece tohoto genu v dospělosti. Existuje několik přístupů, které umožňují studovat geny, jejichž celkový „knockout“ je, jako je tomu v případě *Hic1*, pro zárodek letální.

Tzv. Cre-loxP systém umožňuje specificky vyřadit gen pouze v definovaných buňkách nebo tkáních organismu, zatímco ostatní tkáně zůstávají beze změny. Pro uskutečnění experimentu jsou potřeba dva myší kmeny (obr. 3).

První, který má ve svém genomu kýžený cílový gen ohraničen vloženými homologními sekvencemi DNA, které se nazývají *loxP* (locus of X-over P1) místa. Druhý kmen myši má v genomu vložen gen pro enzym Cre (Cyclization Recombination) rekombinázu, jehož exprese je regulována tkánově specifickým promotorem, tudíž se tento enzym vyskytuje pouze



Obrázek 3 Schéma Cre-loxP systému u myši;
převzato z www.scq.ubc.ca.

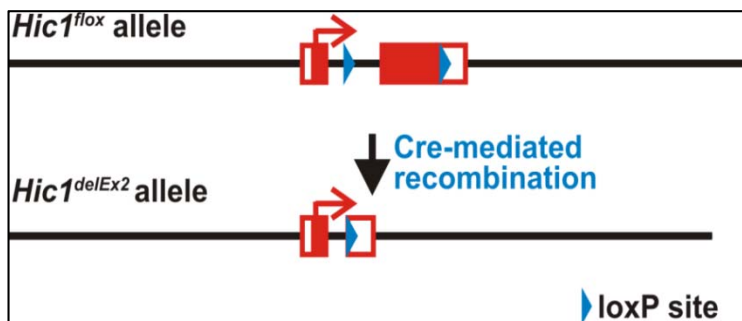
v některých buňkách organismu. Po zkřížení těchto myších kmenů dochází v buňkách exprimujících *Cre* k homologní rekombinaci mezi *loxP* místy a tím k vyštěpení cílového

genu (nebo jeho části a vzniklý produkt je potom nefunkční), přičemž ostatní buňky nesou gen plně funkční.

LoxP místa byla původně převzata z bakteriofága P1 a tato 34 nukleotidů dlouhá sekvence DNA se přirozeně nenachází nikde v živočišném nebo rostlinném genomu. Pravděpodobnost, že by se takováto sekvence v genomu objevila náhodně, je naprosto zanedbatelná, specifita rekombinace mezi vloženými *loxP* místy je tedy zaručena (Sauer, 1998). Existuje velké množství myších kmenů s tkáňově specifickou produkcí *Cre*, nevýhodou ovšem je, že ne vždy je aktivita *Cre* (resp. jejího promotoru) zajištěna pouze pro určitý typ buněk či tkáň. Pro snazší přehled existují databáze těchto kmenů s detailně popsanými vlastnostmi (tzv. expresním profilem) jednotlivých *Cre*.

Pro podmíněnou delecí ve specifických buňkách nebo tkáních dospělého organismu byl *Cre-loxP* systém vylepšen. *Cre* je zde sice nepřetržitě exprimována ze specifického promotoru, ale protože je gen *Cre* fúzován s genem pro estrogenový receptor typu 2 (*CreER^{T2}*), je výsledný fúzní protein udržován v cytoplasmě ve vazbě s proteinem tepelného šoku (Hsp90) a k rekombinaci mezi *loxP* místy tedy nedochází. K uvolnění z vazby s Hsp90, následnému přesunu do jádra a rekombinaci mezi *loxP* místy dochází až po přidání syntetického analogu estrogenového hormonu tamoxifenu. Důsledky vyštěpení cílového genu jsou tedy sledovatelné i z hlediska času uplynulého od zahájení rekombinace (Kühn and Torres, 2002). Tamoxifen je v játrech metabolizován na svou aktivní formu 4-hydroxytamoxifen, což nesmí být opomenuto při experimentech zahrnujících rekombinaci pomocí enzymu *CreER^{T2}* *in vitro*.

Aby mohl být *Cre-loxP* systém využit pro výzkum *Hic1*, byla provedena genová úprava lokusu *Hic1* v embryonálních kmenových buňkách myši. Hlavní kódující oblast druhého exonu *Hic1* byla ohraničena *loxP* místy. Následně byl vytvořen nový kmen myši *Hic1^{fllox}* (Pospichalova et al., 2011). Schéma této alely je zobrazeno na obr. 4. Podmíněná delece umožnila sledování důsledků absence obou alel *Hic1* v určitých cílových tkáních, aniž by narušila expresi *Hic1* v ostatních tkáních.



Obrázek 4 Alela *Hic1^{fllox}* a její rekombinace; upraveno z (Pospichalova et al., 2011).

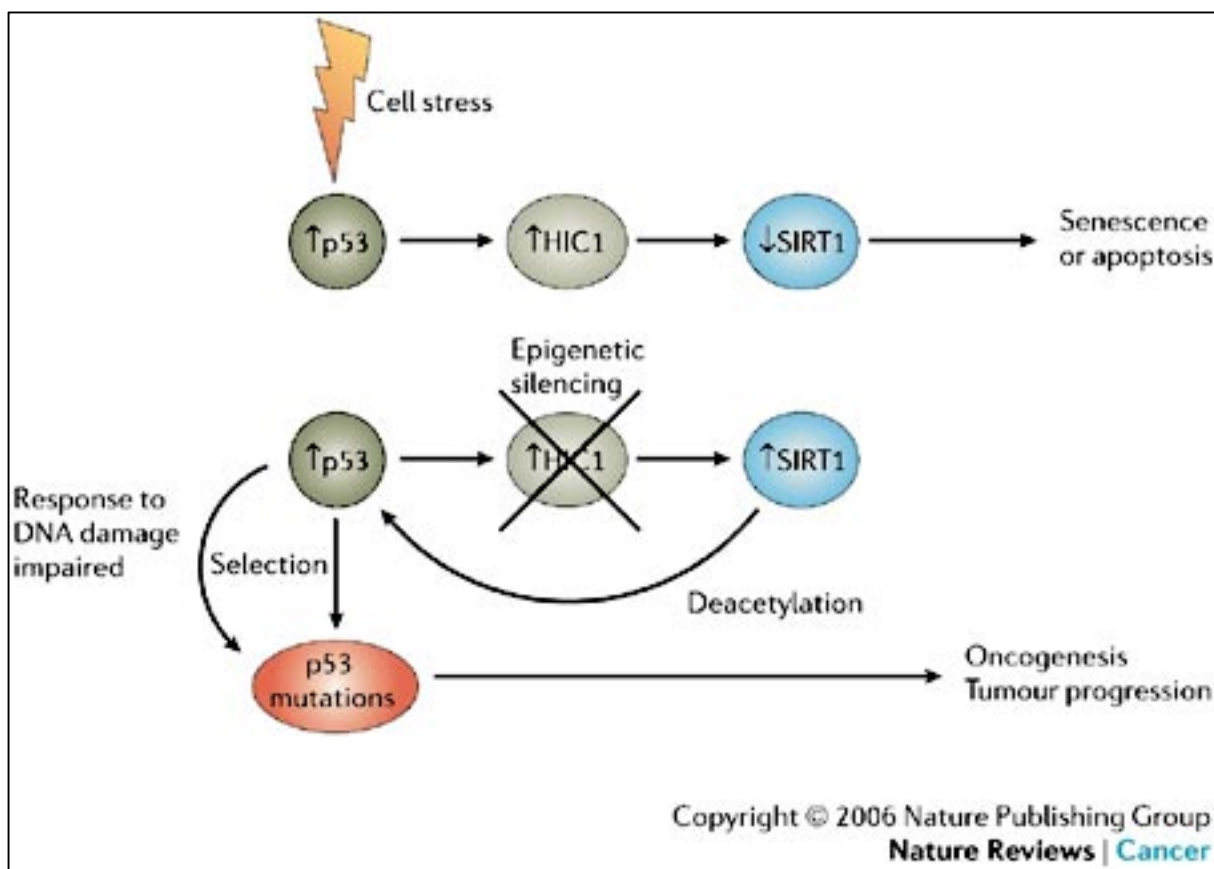
Regulace proteinu HIC1 a odpověď na poškození DNA

HIC1 zasahuje do velkého množství buněčných dějů, a to nejen jako transkripční faktor (prostřednictvím cílových genů), ale také jako interakční partner jiných proteinů. Tyto procesy jsou „zpěťovazebně“ zapojeny do regulačních obvodů, z nichž nejzásadnějšími jsou kooperace s *TP53*, a *E2F1*.

Transkripce genu *HIC1* je pozitivně regulována proteinem p53. Ve své aktivní formě spouští protein p53 transkripci velkého množství genů, jež hrají roli v odpovědi na poškození DNA a zastavení buněčného cyklu až do doby, kdy je DNA opravena. V případě nevratného poškození p53 iniciuje buněčnou smrt (Rodier et al., 2007).

Inaktivace HIC1 (obr. 5) má za důsledek zvýšenou produkci SIRT1, který deacetyluje p53 a tím potlačuje jeho aktivitu. Buňky s nefunkčním *HIC1* mohou pomocí tohoto mechanismu uniknout apoptóze indukované poškozením DNA. Právě přežívání takto poškozených buněk je rizikovým faktorem rozvoje rakoviny (Chen et al., 2005). Důsledkem deregulace vazby HIC1-SIRT1-p53 může být např. výrazně zhoršená prognóza u pacientů s určitými typy rakoviny plic (Tseng et al., 2009).

SIRT1 může, kromě p53, deacetylovat také další proteiny důležité pro udržení



Obrázek 5 Regulační smyčka HIC1-SIRT1-p53 a odpověď na poškození DNA; převzato z (Baylin and Ohm, 2006).

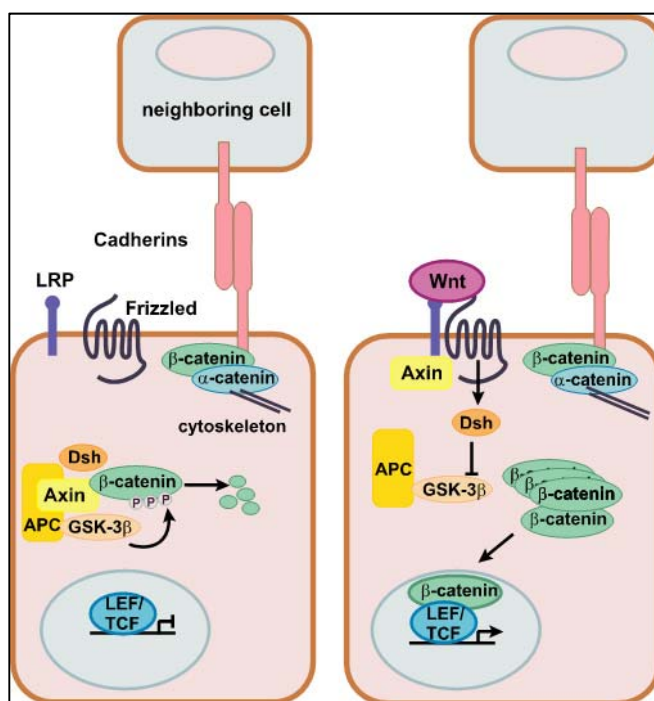
buněčné homeostáze, např. právě *HIC1* (Stankovic-Valentin et al., 2007). Deacetylase má v tomto případě za důsledek zvýšení aktivity *HIC1*, protože je tím umožněna SUMOylace na lysinu 314, *SIRT1* navíc tvoří s *HIC1* prostřednictvím jeho domény BTB/POZ represivní komplex vázající promotor genu *SIRT1*. Tím dochází ke „zpětnovazebnému uzavření“ této regulační smyčky (Chen et al., 2005).

Dalším pozitivním regulátorem exprese *HIC1* je transkripční faktor E2F1. Transkripční faktor E2F1 v buněčném cyklu zprostředkovává přechod z G1 fáze do S fáze (Iaquinta and Lees, 2007). *HIC1* je přímým cílovým genem E2F1, v promotoru *HIC1* se nacházejí dvě oblasti *ERE* (*E2F1 Responsive Element*) umožňující interakci s E2F1 (Jenal et al., 2009). *HIC1* může potlačovat expresi genů, které zprostředkovávají odpověď na E2F1 včetně exprese *E2F1* samotného, čímž může zajišťovat zpětnovazebnou regulaci buněčného dělení (Zhang et al., 2009).

Kanonická signální dráha Wnt

Kanonická signální kaskáda Wnt (dále jen signální dráha Wnt), zjednodušené schéma je na obr. 6, hraje jednu z nejzásadnějších rolí v průběhu zárodečného vývoje, ontogeneze a sebeobnovy buněk a tkání dospělého organismu. Tento systém mezibuněčné komunikace je vysoce konzervovaný u metazoi. Signalizace Wnt zajišťuje vyváženou regeneraci tkání z kmenových buněk, je-li však některá z komponent kaskády poškozena, může dojít k nádorovému zvrhnutí buňky (Logan and Nusse, 2004).

Ústřední molekulou kanonické signalizace Wnt je β -katenin, který je v situaci, kdy neprobíhá signalizace, neustále fosforylován degradačním komplexem a následně štěpen v proteasomu (Aberle et al., 1997). Transkripce cílových genů signalizace Wnt neprobíhá. Situace se změní při vazbě rozpustného ligandu Wnt na komplex receptoru Frizzled s koreceptorem LRP (LDL-Related Protein) (Wehrli et al., 2000), protože je následně spuštěna transdukce signálu proteinu



Obrázek 6 Signální kaskáda Wnt;
upraveno z (Reya and Clevers, 2005).

Dishevelled (Gao and Chen, 2010) a Axin. Zahájení signalizace vede k rozpadu degradačního komplexu a stabilizovaný β -katenin se začne hromadit v cytoplasmě (MacDonald et al., 2009). Následně β -katenin migruje do jádra, kde asociuje se specifickými transkripčními faktory TCF/LEF (T-cell-specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer Factor). Tyto transkripční faktory v komplexu s β -kateninem spouštějí expresi genů iniciujících buněčný cyklus, jako *c-MYC* a *Cyklin D1* (Reya and Clevers, 2005). Existuje řada dalších transkripčních faktorů, které se účastní aktivace cílových genů signalizace Wnt společně s komplexem TCF/ β -katenin, popřípadě vlastnosti tohoto komplexu modifikují (MacDonald et al., 2009). Jedním z těchto modulátorů exprese cílových genů dráhy Wnt je protein Hic1, jenž se v jádře váže na komplex TCF/ β -katenin a tím tlumí jeho aktivitu (Valenta et al., 2006).

Regulace signalizace Wnt probíhá na několika úrovních, první regulace je na úrovni syntézy, zpracování a sekrece ligandů Wnt (Bartscherer and Boutros, 2008), následuje ovlivňování ligandů Wnt extracelulárními proteiny. Zde působí různé skupiny ko-faktorů a inhibitorů (Kawano and Kypta, 2003; Mii and Taira, 2011). Regulace signálu probíhá i na úrovni membránových receptorů cílových buněk (Vincent and Beckett, 2011; Wehrli et al., 2000). V prostředí cytoplasmy dochází k rozmanité regulaci degradace β -kateninu a v jádře je transkripce cílových genů ovlivněna velkým množstvím dalších proteinů.

Mutace způsobující nefyziologickou aktivitu této dráhy probíhá nejčastěji na úrovni genu kódujícího nádorový supresor APC (Adenomatous Polyposis Coli). Mutovaný gen *APC* byl poprvé objeven v dědičném kolorektálním karcinomu - odtud také pochází jeho název. Protein APC je součástí degradačního komplexu β -kateninu a funguje tedy jako vnitrobuněčný negativní regulátor signalizace Wnt. Je-li však poškozen, jeho absence způsobí nepřetržitou transkripci cílových genů signální dráhy Wnt, aniž by k tomu buňka skutečně dostávala impuls z vnějšku (Clevers, 2006). Protein APC se také podílí na exportu β -kateninu z jádra do cytoplasmy, kde může být následně β -katenin degradován (Henderson and Fagotto, 2002).

V populaci buněk střevní výstelky zprostředkovává signalizaci Wnt transkripční faktor TCF-4 (Barker and Clevers, 2010). TCF-4 je hlavním efektozem, který je zodpovědný za udržování a obnovu střevní výstelky a současně je hojně exprimovaným genem v buňkách karcinomu tlustého střeva. Je-li gen *TCF-4* deletován, kmenové buňky terminálně diferencují a epitel tím ztratí schopnost regenerace (Korinek et al., 1998).

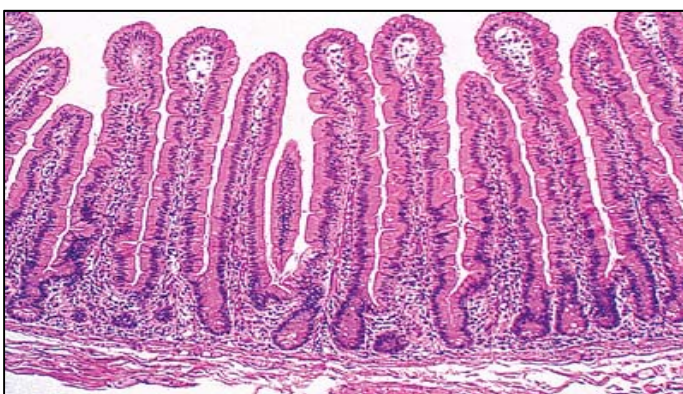
Kromě kanonické signální dráhy Wnt existují další, tzv. nekanonické varianty signalizace. Většina proteinů působících v těchto alternativních signalizačních kaskádách je odlišná od komponent kanonické signální dráhy Wnt. Různé jsou i výsledky nekanonických drah. Např. signalizace dráhou Wnt/PCP (planar cell polarity) ústí v přestavbu cytoskeletu, dráha Wnt/Ca²⁺ zajišťuje uvolnění vnitrobuněčného vápníku (Veeman et al., 2003).

Střevní výstelka

Organizace a dynamika sebeobnovy střevní výstelky

Vnitřní výstelka střeva je neustále v kontaktu s velkým množstvím chemických látek pocházejících ze zpracovávané potravy, dále s různými patogeny a bakteriemi. Ty buď pochází z vnějšího prostředí nebo jsou součástí střevní mikrobioty. Buňky epitelu jsou proto velmi rychle obnovovány.

Vnitřní povrch tenkého střeva je tvořen výčnělky do lumen střeva, které se nazývají klky, a prohlubněmi směrem do mukózní části střeva, jež se nazývají Liberkuhnovy krypty (dále jen „krypty“, obr. 7). Zatímco na povrchu klků probíhá vstřebávání látek z potravy do krevního řečiště, krypty jsou oblastí kmenových a progenitorových buněk. Tato unikátní organizace střevní sliznice maximalizuje plochu, na které probíhá vstřebávání živin. Situace v tlustém střevě je obdobná, ale klky jsou zde nahrazeny nízkou řasou.

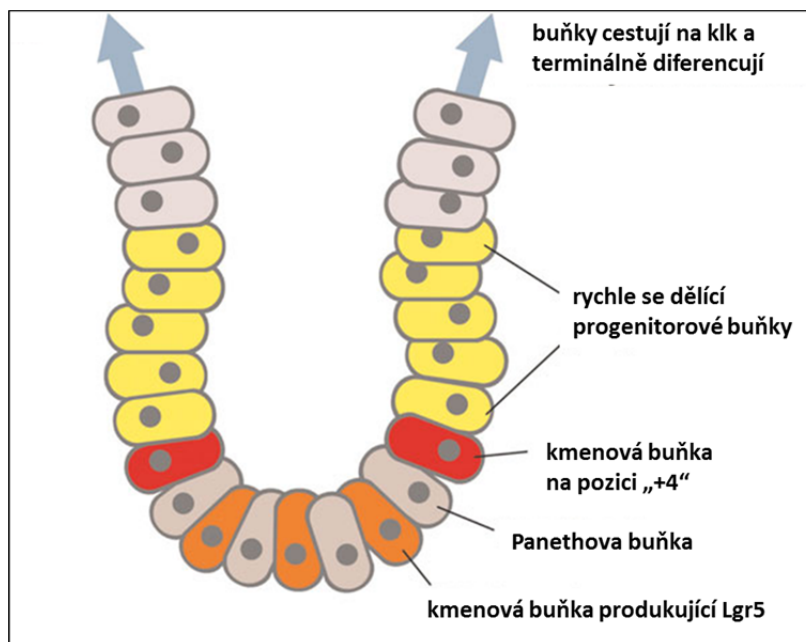


Obrázek 7 Výstelka tenkého střeva (jejunum);
převzato z (Gramlich and Petras, 2007).

Všechny buňky střevního epitelu jsou odvozeny z populace kmenových buněk, která se nachází v kryptě. Dceřiné buňky, vzniklé asymetrickým dělením buněk kmenových, putují do progenitorového kompartmentu, kde prodělají 4-5 rychlých buněčných dělení, poté vycestují na povrch klku a diferencují v jednotlivé funkční typy epiteliálních buněk. Za 3-5 dní doputují buňky k vrcholku klku, kde jsou vytlačeny do lumen střeva a podléhají buněčné smrti typu anoikis. Takovéto uspořádání tkáně, v němž lze jednoznačně identifikovat oblasti, v nichž sídlí kmenové buňky, je v savčím organismu ojedinělé. Proto je střevní epitel výborným modelem pro výzkum kinetiky kmenových buněk a jejich případné patologie (Snippert et al., 2010).

V současné době výsledky výzkumu střevních epiteliálních kmenových buněk naznačují, že sebeobnova buněk střevního epitelu probíhá ze dvou různých zdrojových populací kmenových buněk, což je znázorněno na obr. 8. Kmenové buňky, které produkují protein Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5), se nacházejí na dně krypty vymezeny mezi Panethovy buňky.

Proto jsou tyto buňky také nazývány „crypt base columnar cells“ (CBCs). Kmenové buňky produkující Lgr5 jsou rychle se dělící a jejich proliferace je pod kontrolou signalizace Wnt (Snippert et al., 2010). Druhou populaci kmenových buněk střevního epitelu tvoří buňky produkující faktor Bmi1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) a zároveň



Obrázek 8 Uspořádání střevní krypty;
upraveno z (Karpowicz and Perrimon, 2010).

neprodukují Lgr5. Nacházejí se ve vzdálenosti přibližně čtyř buněk od dna krypty, odtud také pochází jejich alternativní název „+4 cells“. Tyto kmenové buňky se dělí velmi zřídka a jejich buněčný cyklus není závislý na signalizaci Wnt (Karpowicz and Perrimon, 2010).

Poslední výzkumy naznačují, že vzájemné funkční propojení mezi těmito populacemi kmenových buněk může být založeno na jejich odlišné citlivosti k poškození. Zatímco poměrně rychle cyklující kmenové buňky produkující Lgr5 zajišťují pravidelnou obnovu epitelu, kmenové buňky na pozici „+4“ jsou aktivovány v případě poranění tkáně. Kmenové buňky produkující Lgr5 např. snadno podléhají smrti po ozáření, naopak kmenové buňky na pozici „+4“ odolávají i vysokým dávkám ozáření a jsou poté navíc schopny znovu obsadit kryptu vyprázdněnou zánikem rychle se dělících kmenových buněk a zajistit tak obnovu střevního epitelu (Tian et al., 2011; Yan et al., 2012).

Typy buněk ve střevní výstelce a jejich regulace

Kromě dvou populací kmenových buněk, se ve střevním epitelu vyskytuje šest typů diferencovaných buněk. Největší podíl tvoří enterocyty, zajišťující absorpci živin, dále tři hlavní druhy sekrečních buněk; pohárkové buňky produkující hlen, jež zajišťuje plynulý průchod tráveniny střevem, enteroendokrinní buňky sekretující hormony spojené s regulací trávení a Panethovy buňky, jež produkují látky baktericidní povahy a jako jediné neputují na klk, nýbrž na dno krypty, kde žijí 6-8 týdnů (van der Flier and Clevers, 2009). Řídce se také vyskytují buňky produkující opioidy, tzv. tuft cells (Gerbe et al., 2011) a buňky „M“

Regulace vzniku jednotlivých typů buněk podléhá signalizaci Notch (Fre et al., 2005). Rozhodnutí, zda se buňka stane enterocytem nebo diferencuje do jednoho z typů sekretních buněk, probíhá v progenitorovém kompartmentu (obr. 9).

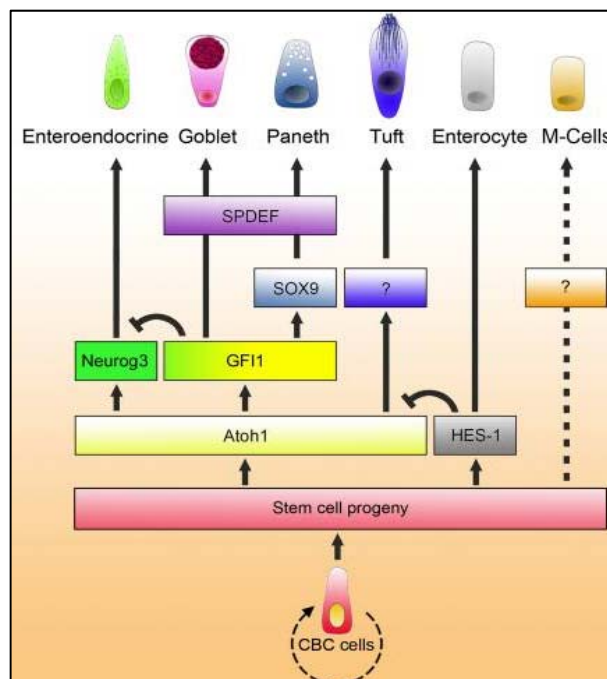
Buňka, jež kontaktem se sousední buňkou aktivuje dráhu Notch, následně „zapne“ produkci proteinu Hes-1 (Hairy/Enhancer of Split 1). Hes-1 tlumí expresi *Atoh1* a buňka diferencuje v enterocyt. Buňka, která není ovlivněna

signálem Notch, produkuje Atoh1 a tím je nasměrována do sekretorní linie. *Atoh1* je cílovým genem *Hic1* (viz kapitola Cílové geny *Hic1*), tzn. za fyziologických podmínek by měl *Hic1* negativně regulovat množství produkovaného Atoh1 a tím i množství diferencovaných sekretorních buněk.

V rámci sekretorní linie enteroendokrinní buňka vyžaduje pro svůj vznik Neurog3 (Neurogenin3), pro diferenciaci v pohárkovou (angl. „goblet cell“) nebo Panethovu buňku je nezbytný Gfi1 (Growth Factor Independent 1), přičemž pro maturaci Panethovy buňky je dále nutná produkce Sox9 (Gerbe et al., 2011).

Absence genu *Atoh1* ústí ve ztrátu sekretorních buněčných typů střevního epitelu (Shroyer et al., 2007). Naopak nadměrná exprese *Atoh1* vede ke změně poměru buněčného složení epitelu, a to výrazně ve prospěch sekretorních buněk a k téměř kompletní ztrátě enterocytů (VanDussen and Samuelson, 2010).

Možnost důkladného studia střevních epitelálních buněk *in vitro* byla po dlouhou dobu nedosažitelná, i když existovaly úspěšné pokusy o ustanovení buněčných střevních epitelálních kultur z krysích (Evans et al., 1992; Fukamachi, 1992) i lidských buněk



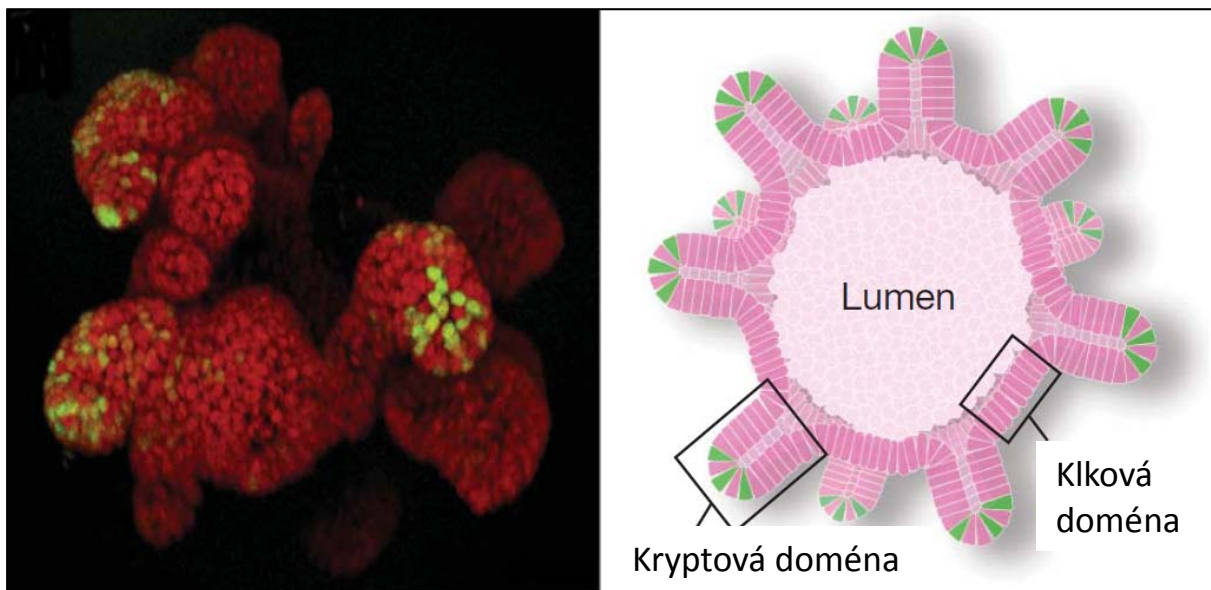
Obrázek 9 Transkripční regulace buněk
střevního epitelu;
upraveno z (Gerbe et al., 2011).

(Perreault and Beaulieu, 1996). Metodickým problémem byla zejména krátká životnost buněk rostoucích v podmínkách *in vitro*.

Průlomovým objevem na tomto poli výzkumu bylo až odvození kultury střevních epiteliálních organoidů ze střevních krypt myši, přičemž kulturu organoidů bylo následně možné množit po mnoho měsíců. Střevní epiteliální organoidy vznikají kultivací jednotlivých izolovaných krypt, které se během jednoho dne po izolaci ze střeva uzavírají a změni tvar z „U“ na „O“. Postupem času začínají z uzavřených organoidů „pučet“ nové krypty, za dva týdny v průměru 40 krypt na organoid, čímž dostává organoid svůj charakteristický tvar, viz dále. Při pasážování je organoid mechanicky rozvolněn na jednotlivé krypty a ty jsou dále kultivovány v čerstvém médiu. (Sato et al., 2009).

Struktura organoidu zachovává členění na „domény“ odpovídající kryptám a klkům střeva (obr. 10). V kryptové doméně se nacházejí kmenové buňky produkující Lgr5 (zeleně) a Panethovy buňky. Klková doména je oproti stavu ve střevě plochá, nicméně jsou v ní obsaženy všechny odpovídající typy diferencovaných střevních epiteliálních buněk. Toto výjimečné uspořádání buněčné kultury umožňuje studium komplexních vztahů ve střevním epitelu za standardizovaných podmínek *in vitro*.

Pro metodickou optimalizaci kultivace bylo využito poznatků o regulaci střevních epiteliálních kmenových buněk. Aby byla kultivace úspěšná, musí médium obsahovat protein R-spondin, protože důsledkem jeho působení je zesílení signalizace Wnt a tudíž i podpora aktivity střevních epiteliálních kmenových buněk produkujících Lgr5 (Kim et al., 2005). Druhým nezbytně nutným proteinem je noggin, který je negativním regulátorem signalizace



Obrázek 10 Střevní epiteliální organoid; vlevo: kmenové buňky produkující Lgr5 (zelená) a ostatní epiteliální buňky (červená). Vpravo: schéma řezu organoidem znázorňující jednotlivé domény odpovídající uspořádání ve střevě *in vivo*; upraveno z (Sato et al., 2009).

BMP. Díky přítomnosti nogginu v médiu je umožněna početní expanze krypt organoidu (Haramis et al., 2004). Posledním z klíčových faktorů je EGF (Epithelial Growth Factor), protože stimuluje růst střevního epitelu (Dignass and Sturm, 2001). Pro umožnění vzniku prostorového uspořádání organoidů je nutné používat substrát bohatý na lamininy, což je další z podmínek „imitujících“ situaci *in vivo* (Sasaki et al., 2002).

Střevní epiteliální organoidy se podařilo odvodit i z jednotlivých střevních epiteliálních kmenových buněk produkujících Lgr5 (Sato et al., 2009). Úspěšnost této derivace byla ale velmi nízká, organoidy utvořilo pouze 5 % izolovaných kmenových buněk. Procentuální úspěšnost tvorby organoidů významně zvýšila metoda kultivace směsi kmenových buněk produkujících Lgr5 a Panethových buněk. Takto tvořené organoidy vznikaly ze 60 % Lgr5 buněk, což poukázalo na zásadní význam Panethových buněk coby tvůrců tkáňové niky pro kmenové buňky střevního epitelu (Sato et al., 2011).

Materiál a metody

Použité myší kmeny a podmíněná delece genu *Hic1* in vivo

Myší kmen *Hic1^{flox}* byl vytvořen v laboratoři V. Kořínka (Pospichalova et al., 2011). Kmen nesoucí gen pro tamoxifenem aktivovatelnou Cre *ROSA26-CreER^{T2+}* byl získán z Jackson Laboratory. Lokus *ROSA-26* je exprimován ve všech buňkách myšího organismu. Kmen *ROSA26-CreER^{T2+}* byl vytvořen rekombinací lokusu *ROSA-26* s komplementární plasmidovou DNA obsahující *CreER^{T2+}*, tzv. „knock-in“ (Ventura et al., 2007).

Kmen *Villin1-CreER^{T2+}* byl získán z laboratoře Dr. Sylvie Robine (el Marjou et al., 2004). Lokus *Villin1* je exprimován pouze v epiteliálních buňkách střeva, včetně kmenových buněk, a částečně v ledvinách. Kmen *Villin1-CreER^{T2+}* byl vytvořen pomocí mikroinjekce vektoru do pronukleu oplozeného vajíčka (tzv. transgeneze).

Po zkřížení *Hic1^{flox}* s kmeny nesoucími gen pro tamoxifenem aktivovatelnou Cre byla indukována rekombinace alely *Hic1* pomocí tamoxifenu, jenž byl podán intraperitoneální injekcí v sedmi dávkách po 48 h (vždy 2 mg tamoxifenu (Sigma) rozpuštěné v 0,1 ml slunečnicového oleje). Princip podmíněné delece genu je vysvětlen v teoretickém úvodu.

Expresní čipová analýza a podmíněná delece genu *Hic1* in vitro

Pro expresní čipovou analýzu bylo použito 500 ng celkové RNA izolované pomocí RNA Blue reagent (Top Bio) získané ze vzorku myších embryonálních fibroblastů (dále jen MEFs (angl. mouse embryonic fibroblasts)) genotypu *Hic1^{flox/flox}-ROSA26-CreER^{T2+/-}*.

Ráno po připuštění chovného páru byla zkontrolována vaginální zátka, díky níž lze bezpečně poznat, že je samice březí. Po dosažení požadovaného stáří zárodků 14,5 dne byla izolována děloha a z ní v laminárním boxu jednotlivá embrya, která byla ve fosfátovém pufru (dále jen PBS (angl. phosphate buffered saline)) zbavena tzv. červených tkání a nařezána do roztoku Trypsin/EDTA (Gibco), ve kterém došlo k rozvolnění tkání a poté přendána kultivačních misek o průměru 10 cm s médiem (DMEM (angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium) + 10% fetální telecí sérum, 1% glutamin, 1% neesenciální aminokyseliny, 1% antibiotikum (penicilin/streptomycin)). Z každého embrya byla oddělena část tkáně za účelem genotypování.

Za 24 h v termoboxu s 5% CO₂ MEFs „vycestovaly“ z fragmentů embryonálních tkání na kultivační misku, tudíž bylo možné vyměnit médium se zbytky tkání za čerstvé. Dále byly

MEFs kultivovány za stejných podmínek, pasážovány byly 1x za tři dny v poměru 1:3. Použité genotypy: *Hic1^{flox/flox}-ROSA26-CreER^{T2+/-}*, *Hic1^{flox/flox}-ROSA26-CreER^{T2-/-}*, *Hic1^{+/-}-ROSA26-CreER^{T2+/-}*.

Homologní rekombinace mezi *loxP* místy byla indukována 4-hydroxytamoxifenem (aktivovaná forma tamoxifenu používaného pro indukci rekombinace *in vivo*) ve výsledné koncentraci 1 μ M v médiu. Kontrolní skupině bylo přidáno pouze rozpouštědlo 4-hydroxytamoxifenu etanol. Sběr RNA probíhal v časových intervalech 24 h, 48 h, 72 h a 120 h od indukce rekombinace. Experiment byl proveden ve formě technického duplikátu.

Pro expresní analýzu byl použit hybridizační čip Illumina MouseRef8 v2.0 Expression BeadChip a vyhodnocení dat proběhlo LIMMA analýzou (provedl Ing. Hynek Strnad, PhD, Servisní laboratoř funkční genomiky a bioinformatiky).

Genotypování

Před genotypováním byla tkáň degradována proteinázou K (Thermo Scientific, pufr: 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH8; 25 mM EDTA, pH8; 0,5% dodecylsírán sodný, použito bylo 5 μ l proteinázy K (600 U/ml) a 300 μ l pufru na jeden vzorek) 3 h při 56°C. Následně bylo odebráno 100 μ l roztoku s DNA, ta byla sražena isopropanolem (100 μ l), promyta 70% etanolem a následně byla DNA rozpuštěna ve vodě. Pro genotypování byl použit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific). Použité primery: *ROSA-CreER^{T2}* forward (bez *Cre*): AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT, reverse (bez *Cre*): GGAGCGGGAGAAATGGATATG, reverse (s *Cre*): CCTGATCCTGGCAATTTTCG; *TP53*: forward („wild-type“): ATCCCGAGTATCTGGAAGACAGGC, forward (mutace): TTTGAATGGAAGGATTGGA GCTACGG, reverse („wild-type“ + mutace): GAAACAGGCTAACCTAACCTACCACGC; *Hic1-loxP*: forward: CCCCACCTTTCTACACCTCA, reverse: GAGAGGCAGGGTTCTCCTTT. Program: úvodní denaturace 98°C 3:30 min, denaturace 98°C 30 s, hybridizace primerů 56°C 20 s, prodloužení řetězce 72°C 20 s, dosyntetizování řetězců 72°C 2 min, 37 cyklů. Platí pro *Hic1-loxP* a *TP53*, pro *ROSA-CreER^{T2}* je čas hybridizace primerů 30 s (56°C) a prodloužení řetězce 55 s (72°C).

Histologie a imunohistochemické barvení střevní tkáně po ztrátě genu *Hic1*

Metoda umožňuje specifickou detekci proteinu na řezu tkání. Bylo postupováno podle následujícího protokolu:

Prvním krokem byla indukce delece *Hic1 in vivo*. Po 21 dnech byla střeva izolována, promyta PBS a fixována 24 h 4% formaldehydem v PBS. Poté byly tkáně převedeny do xylenu v automatickém tkáňový procesoru (Leica ASP200S), zality do parafínu pomocí zalévací stanice (Leica EG1150H), nařezány na mikrotomu (Leica RM2255) na 4 µm silné řezy, které byly zavodněny deparafinační řadou (xylen I 8 min, xylen II 8 min, 100% etanol I 5 min, 100% etanol II 5 min, 95% etanol 3 min, 70% etanol 3 min, destilovaná voda 3 min). Následně byly tkáně na řezech denaturovány (20 min při 100°C v 0,5 mM citrátu ve vodě, pH=6, polysorbátový detergent: 0,0025% Tween 20), zchlazeny a promyty 3x 5 min v TBS (Tris-buffered saline, složení: 50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl).

Membrány buněk na řezech byly permeabilizovány a zároveň byla deaktivována endogenní peroxidáza (0,3% H₂O₂ v metanolu, 25 min při pokojové teplotě), následoval promyv 3x 5 min v TBS.

Na řezy byl aplikován blokační roztok (5% kozí sérum a 1% hovězí sérový albumin v TBS, 2 h při 4°C ve vlhké komůrce) a následně roztok primární protilátky v témže roztoku. Použity byly následující primární protilátky králíčího původu: Lyzozym 4000x zředěno (A0099, Dako), Chromogranin A 400x zředěno (ab45179, Abcam). Řezy byly s primárními protilátkami inkubovány přes noc při 4°C, druhý den byly řezy promyty 1x v TBS s 0,01% Triton X-100 (detergent pro snížení povrchového napětí) a 4x v TBS.

Pro detekci primární protilátky byly použity biotinylované sekundární protilátky kozího původu proti králíčímu antigenu (Vector BA-1000) v ředění 1:750 v TBS s 5% kozím sérem, 1 h při pokojové teplotě. Následoval stejný oplach jako po předchozím kroku. Pro zesílení signálu byl použit kit s avidinem a biotinylovanou křenovou peroxidázou (Vectastain ABC). Avidin je zde vázán na biotinylovanou sekundární protilátku a následně utváří společně s biotinylovanou křenovou peroxidázou pevný komplex, který zintenzivňuje následující detekci. Oplach je stejný jako předchozí.

Detekce značených proteinů proběhla pomocí diaminobenzidinu (30 mg/100 ml 50 mM Tris, pH=7,5, 0,018% H₂O₂ několik sekund/minut (dle vývoje signálu, hodnoceno

s pomocí binolupy) při 37°C) Princip této reakce spočívá v přeměně diaminobenzidinu křenovou peroxidázou na barevný produkt. Reakce byla zastavena oplachem ve vodě.

Jádra buněk byla poté obarvena hematoxylinem, řezy odvodněny (deparafinační řada v opačném směru) a zality do solakrylu. Všechny histologické řezy byly analyzovány na mikroskopu Leica DM 6000 B při zvětšení 100x.

Pro některé histologické řezy bylo použito detekce za použití fluorescenční sekundární protilátky. Od klasické imunohistochemie se protokol lišil po provedené denaturaci, po níž následovala aplikace blokačního roztoku a primárních protilátek. Použité primární protilátky: Lysozym 4000x (A0099, Dako), Chromogranin A 400x (ab45179, Abcam). Po promytí následovala sekundární protilátka Alexa 488 (Molecular Probes A-11034) zředěná 750x. V závěru bylo provedeno převedení hydratovaného preparátu do Mowiolu (Sigma). Plocha pozitivních buněk byla měřena v programu ImageJ.

Pro detekci pohárkových buněk byly řezy odvodněny v deparafinační řadě a byla použita sada PAS Periodic Acid Schiff acc.Hotchkiss-Mc Manus (Diapath). Princip spočívá v oxidaci polysacharidů na aldehydy, které poté reagují se schiffovým činidlem, přičemž vzniká fuchsiové zbarvení. Pohárkové buňky byly počítány v programu Ellipse.

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Metoda je určena pro zjištění úrovně exprese určitého genu podle množství mRNA. Nejprve je totální RNA pomocí reverzní transkriptázy přepsána do komplementární cDNA, následuje polymerázová řetězová reakce v reálném čase (dále jen qPCR), během které je v každém cyklu změřeno množství nově syntetizované DNA. Množství nově syntetizované DNA je určeno podle intenzity fluorescence interkalačního činidla.

RNA byla z MEFs izolována a její koncentrace byla změřena na spektrofotometrickém přístroji Nanodrop. Přepis prvního vlákna cDNA byl proveden pomocí sady pro reverzní transkripci RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Do každé reakce byl použit 1 µg RNA.

Následovala příprava qPCR. Do 384 jamkové desky bylo napipetováno vždy 2,5 µl LightCycler 480 SYBR Green I Master (2x koncentrovaná směs DNA polymerázy, deoxynukleotid trifosfátů, fluorescenčního interkalačního činidla a MgCl₂) a 0,5 µl směsi dvou primerů tak, aby výsledná koncentrace primerů byla 0,5 µM. Následně byly do jamek napipetovány 2 µl cDNA 10x naředěné v DEPC (diethyl pyrokarbonát) H₂O. Reakce byly pipetovány v technickém triplikátu. Ke každému triplikátu byly analogicky napipetovány dvě jamky s kontrolním vzorkem (reverzní transkripce vzorku RNA bez přidání reverzní

transkriptázy). Protože SYBR Green I je fluorescenční činidlo, byly jamky postupně zakrývány pro zamezení přístupu světla.

Primery použité pro qPCR reakci:

gen	orientace	sekvence
<i>Ubb</i>	forward	ATGTGAAGGCCAAGATCCAG
	reverse	TAATAGCCACCCCTCAGACG
<i>Actb</i>	forward	GATCTGGCACCACACCTTCT
	reverse	GGGGTGTGTAAGGTCTCAA
<i>Gapdh</i>	forward	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
	reverse	ATCCACAGTCTTCTGGGTGG
<i>Hic1 (1)</i>	forward	GGCGCCAGGGATGACAACCC
	reverse	GGGTCACCTAGGGCGCATGC
<i>Hic1 (2)</i>	forward	GAGGCTGCTGAGGTGGCTGC
	reverse	CTCTTGTCGCAGGACGCGCA
<i>Dapk2</i>	forward	CAGCGCAGCCTTTCGCCGAT
	reverse	TGCATACTCCAGCCCCGTGC
<i>Tlr2</i>	forward	GTTTCATCTCTGGAGCATCCG
	reverse	ACTCCTGAGCAGAACAGCGT
<i>Wfdc2</i>	forward	TGGACCGAGCGAAGGAGAGC
	reverse	GGGGCAGGTGCCCTGCTTTT
<i>Hsbp6</i>	forward	GCCCCCAGTGTGGCGTTACC
	reverse	CCTCGTGCCGAGCATGGACC
<i>Cbr2</i>	forward	AGGGCCACACAAGATCCGGG
	reverse	CCTCAGTGGGTGGCGCTCCT
<i>Angptl7</i>	forward	GCACAGCTCCGAAAAGGTGGCT
	reverse	GGCTTGAAGGCTTCTGGGCGG
<i>Tmco1</i>	forward	AGTGGTGGCAAAGCTCCCCT
	reverse	CGTGAAGGGGCGAGGCCAAG
<i>Cxcr7</i>	forward	AAGGTTAGCGTGACTTCAGTTTTGACT
	reverse	CCGTGCCGGTACAAAACACCAC
<i>Efnal</i>	forward	GCATGGCCCGGAGAAGCTGT
	reverse	AGTCCGCTGGCAGTGCAACC
<i>Axin2</i>	forward	GCTGGAGAAGCTGAAACTGG
	reverse	GACAGGTGGTCGTCCAAGAT
<i>Sirt1</i>	forward	GCAGATTAGTAGGCGGCTTG
	reverse	AGCGCCATGGAAAATGTAAC
<i>Sox9</i>	forward	GTGGCCCCGGTTTCGTTCTCTGT
	reverse	CGGCTCTAAACCCGGGGAAGG
<i>Bmi1</i>	forward	TGTGTCCTGTGTGGAGGGTA
	reverse	TTGAAAAGCCCTGGGACTAA

gen	orientace	sekvence
<i>Olfm4</i>	forward	<i>TGGGCAGAAGGTGGGACTGTGT</i>
	reverse	<i>TGTCAGCGGGAAAGGCGGTA</i>
<i>SI</i>	forward	<i>TTCAAGAAATCACAAACATTCAATTACCTAG</i>
	reverse	<i>CTAAAACTTTCTTTGACATTGAGCAA</i>

Reakce proběhla v cykléru LightCycler 480 (Roche) v následujícím programu: po počáteční denaturaci při 95°C 5 min následovalo 45 cyklů složených z denaturace 20 s při 96°C, hybridizace primerů 20 s při 60°C, prodloužení řetězce 30 s při 72°C. Na závěr byla změřena křivka tání v rozmezí 55-95°C (křivka tání umožňuje kontrolu, zda je produkt reakce specifický).

Výsledná data byla zpracována v programu LightCycler 480 Software. Bylo zjištěno pořadí cyklu, ve kterém množství amplifikovaného fragmentu DNA dosáhne tzv. prahu detekce (Cp). Normalizace byla provedena v tabulkovém procesoru Microsoft Excel.

Izolace střevních krypt pro qPCR

Tenká střeva byla izolována 7 a 21 dní po indukci rekombinace tamoxifenem. Pro získání jednotlivých částí střevního epitelu byla střeva promyta PBS, obrácena epitelem směrem ven, rozdělena na morfologické úseky (duodenum, jejunum, ileum) a inkubována na ledu 15 min v roztoku 2 mM EGTA (angl. ethylene glycol tetraacetic acid, chelatační činidlo) v PBS. Uvolněná část epitelu byla do tohoto roztoku mechanicky vytřepána. Stejný postup byl zopakován ještě dvakrát, tím byly získány tři buněčné frakce epitelu. První obsahovala především klky, druhá spodní část klků a třetí krypty. Následovala izolace RNA, reverzní transkripce a qPCR.

Kultivace střevních epiteliálních organoidů

Etablování kultury střevních organoidů bylo provedeno podle popsaného postupu (Sato and Clevers, 2013). Pro izolaci byly použity myši kmene *Hic1^{fllox/fllox}-ROSA26-CreER^{T2+/-}*.

Reagencie:

Matrigel (BD #356231)

Advanced DMEM/F12 (Invitrogen #12634-034)

GlutaMax 100x (Invitrogen #35050-068)

HEPES 1 M (Invitrogen #015630-056)

Penicillin/Streptomycin 10K U/ml 10K µg/ml 100x (Invitrogen #15140-122)

N2 supplement 100x (Invitrogen #17502-048)
B27 supplement 50x (Invitrogen #17504-044)
N-Acetylcystein (Sigma-Aldrich #A9165-5G)
mR-Spondin 1 50 µg (R&D #3474-RS-050)
mNoggin 100 µg (Peprotech #250-38)
mEGF 1 mg (Invitrogen Biosource #PMG8043)
0,5 M EDTA pH=8
PBS
FBS (telecí fetální sérum, angl. „fetal bovine serum”)

Materiál:

Filtry 70 µm (BD Falcon 352350)
50ml centrifugační zkumavky
24 jamkové desky
Pasteurovy pipety

Postup:

1 ml Matrigelu byl rozpuštěn na ledu a inkubován v chladu (spotřeba Matrigelu 50 µl na jamku, zásobní roztok vystačí na 20 jamek), následně bylo připraveno médium Ad-DF⁺⁺⁺:
500 ml Advanced DMEM/F12
5 ml Glutamax
5 ml HEPES
5 ml Penicilin/Streptomycin
Toto médium je možné skladovat 4 týdny při 4°C.

K 50 ml PBS bylo přidáno 250 µl EDTA (dále jako PBS/EDTA).

Ke 45 ml PBS bylo přidáno 5 ml telecího fetálního séra (dále jako PBS/FBS).

Tenké střevo bylo odebráno, očištěno od tuku a na ledu promyto PBS. Pomocí úzkých nůžek bylo střevo rozstřiženo po celé délce a vnitřní povrch opláchnut PBS. Nůžkami s tenkými čepelemi bylo střevo rozevřeno a sliznice seškrábnuta pomocí krycího skla. Tato část vyžaduje určitou zručnost, protože cílem je odstranit co nejvíce klků a krypty přitom nechat nedotčené. Střevo bylo omyto PBS a nastříháno na 2-4 mm dlouhé části, které byly přendány

do 50ml zkumavky. Bylo přidáno 10 ml PBS a celý objem zkumavky byl několikrát pipetován nahoru a dolů přes 10ml pipetu. Supernatant byl odstraněn a přidáno nové PBS. Předchozí krok byl opakován, dokud nebyl supernatant čirý (po přibližně 15 oplačích). Po posledním slití supernatantu bylo k fragmentům střeva přidáno 25 ml PBS/EDTA, následně proběhla 30min inkubace na ledu. Během inkubace bylo připraveno médium:

250 ml Ad-DF⁺⁺⁺

5 ml B27 (50x)

2,5 ml N2 (100x)

250 µl N-Acetylcysteinu (z 500 mM zásobního roztoku)

Toto částečné médium může být skladováno několik týdnů při 4°C.

Kompletní médium pro kultivaci střevních epiteliálních organoidů bylo nutné připravit z částečného média vždy čerstvé. Pro 10 ml (počítáno 500 µl media na jamku) je složení následující:

9960 µl částečného média (Ad-DF⁺⁺⁺ B27,N2,NAc)

20 µl R-Spondin 1 (500x)

10 µl Noggin (1000x)

10 µl EGF (1000x)

Před další prací se střevními fragmenty byla pro předehřátí 24 jamková kultivační deska vložena do termoboxu s 37°C, připraveny čtyři 50ml zkumavky, na jejichž otvor byly přiloženy 70 µm filtry a centrifuga předchlazena na 4°C.

Po inkubaci fragmentů střeva s PBS/EDTA byl odstraněn supernatant a přidáno 10 ml PBS/FBS. Celý objem zkumavky byla pipetován několikrát (3-5x) nahoru a dolů přes 10ml pipetu a supernatant přepipetován přes filtr do nové zkumavky. Byl přidán nový objem PBS/FBS k fragmentům a stejný krok zopakován ještě 3x, pokaždé s novým filtrem a zkumavkou, tím byly získány čtyři různé frakce krypt.

Frakce byly stočeny 5 min 800 rpm při 4°C, supernatant odstraněn a peleta resuspendována v 10 ml částečného media (Ad-DF⁺⁺⁺ B27,N2,NAc). Následovalo stočení 2 min při 600 rpm (4°C), za účelem odstranění jednotlivých buněk. Na mikroskopu byl zkontrolován objem jednotlivých frakcí a koncentrace krypt. Druhá, třetí a čtvrtá frakce byly

smíchány (první frakce většinou obsahovala velké množství buněčných zbytků). Poté bylo ke směsi frakcí opět přidáno částečné médium a následovalo další stočení vzniklého objemu krypt při 600 rpm a 4°C (5 min) a důkladné odstranění supernatantu.

Na 20 jamek by mělo být množství vysetých krypt 1000-10000. Studenou špičkou byl ke kryptám přidán 1 ml Matrigelu a celý objem opatrně promíchán tak, aby nevznikaly bubliny. Do jedné jamky předeřtávané 24 jamkové desky bylo pipetováno 50 µl směsi Matrigelu a krypt, opět bez bublin, přičemž vzniklá kapka se nechala samovolně volně roztáhnout na dně (1-2 min po napipetování všech dvaceti jamek). Deska byla dána do termoboxu na 5-10 min, aby Matrigel ztuhl. Po vyndání bylo do desky přidáno 500 µl kompletního média na jamku a deska byla vrácena zpět do termoboxu (37°C, 5% CO₂). Za 2 dny začaly organoidy pučet, medium bylo měněno 1x za 2-3 dny (použito celkem 750 µl kompletního média).

Pasážování bylo prováděno každých 10 dní v poměru 1:3. Před pasážováním byly Pasteurovy pipety vytaženy nad kahanem do kapilár. Bylo rozpuštěno odpovídající množství matrigelu na ledu, připraveno kompletní médium, nová kultivační 24 jamková deska předeřtává v termoboxu a centrifuga předchlazena na 4°C.

Z jamek bylo odstraněno staré médium a Matrigel s organoidy nataven 1 ml studeného Ad-DF⁺⁺⁺. Obsah jamky byl přendán do 15ml zkumavky. Jamka byla ještě jednou propláchnuta 1 ml studeného média. Kapilára byla předvlhčena vodou, aby na jejích stěnách neulpívaly organoidy, a směs s organoidy byla několikrát (10x) protáhnutá kapilárou. Celou dobu bylo pracováno na ledu. Organoidy byly tímto procesem dezintegrovány na menší části až jednotlivé krypty. K fragmentům organoidů bylo přidáno 2 ml studeného média Advanced DMEM/F12 a následovalo stočení 2 min při 600 rpm (4°C). Supernatant byl pečlivě odstraněn, přidáno požadované množství Matrigelu a pipetováno do nové 24 jamkové desky. Pokračování bylo stejné jako při zavádění kultury.

Proliferační analýza a fluorescenční barvení organoidů

Pro detekci proliferujících buněk organoidů byl použit Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Invitrogen) podle návodu. Modifikované báze jsou začleňovány pouze do nově syntetizované DNA, následně jsou detekovány a vizualizovány pomocí fluorescence. Všechny organoidy byly analyzovány na mikroskopu Leica DM 6000 B při zvětšení 100x. Plocha proliferujících buněk byla měřena v programu ImageJ.

Barvení organoidů fluorescenční protilátkou probíhalo analogicky jako barvení histologických řezů, ale v mikroskopavkách. Plocha detekovaných buněk byla měřena v programu ImageJ. Primární protilátka: Lyzozym 4000x (A0099, Dako). Sekundární protilátka: Alexa 488 750x (Molecular Probes A-11034).

Výsledky

Hledání nových cílových genů *Hic1*

Studium biologické funkce *Hic1* *in vitro*

Jak je uvedeno v literárním úvodu je v současné době známo pouze jedenáct přímých cílových genů *Hic1*. Pro nalezení dalších cílových genů byla provedena mikročipová analýza mRNA z MEFs. Tento přístup se nám jevil fyziologičtějším, než je alternativní postup hledání cílových genů, a to infikováním *Hic1*^{-/-} buněk adenovirovým expresním vektorem se zabudovaným *Hic1* a jeho následnou expresí v buňce na hladinu až 1000x přesahující fyziologické hodnoty.

U myši genotypu *Hic1*^{flox/flox}-*ROSA26-CreER*^{T2+/-} probíhá nepřetržitá produkce CreER^{T2} fúzního proteinu složeného z Cre rekombinázy a modifikovaného estrogenového receptoru. Tento fúzní protein je držen v cytoplasmě vazbou k Hsp90. K translokaci Cre rekombinázy do jádra a následné rekombinaci mezi *loxP* místy dochází až po přidání analogu estrogenů tamoxifenu.

MEFs genotypu *Hic1*^{flox/flox}-*ROSA26-CreER*^{T2+/-} byly izolovány z 14,5 dne starých zárodků a následně v nich byla indukována pomocí 4-hydroxytamoxifenu (aktivovaná forma tamoxifenu pro použití *in vitro*) rekombinace *in vitro*. Kontrolní skupině byl přidán etanol, který slouží jako rozpouštědlo pro 4-hydroxytamoxifen, rekombinace u ní tudíž neproběhla. RNA byla odebrána 24 h, 48 h, 72 h a 120 h po aktivaci. Následně byla ověřena koncentrace a kvalita (Agilent) RNA a provedena hybridizace na expresním čipu (Illumina).

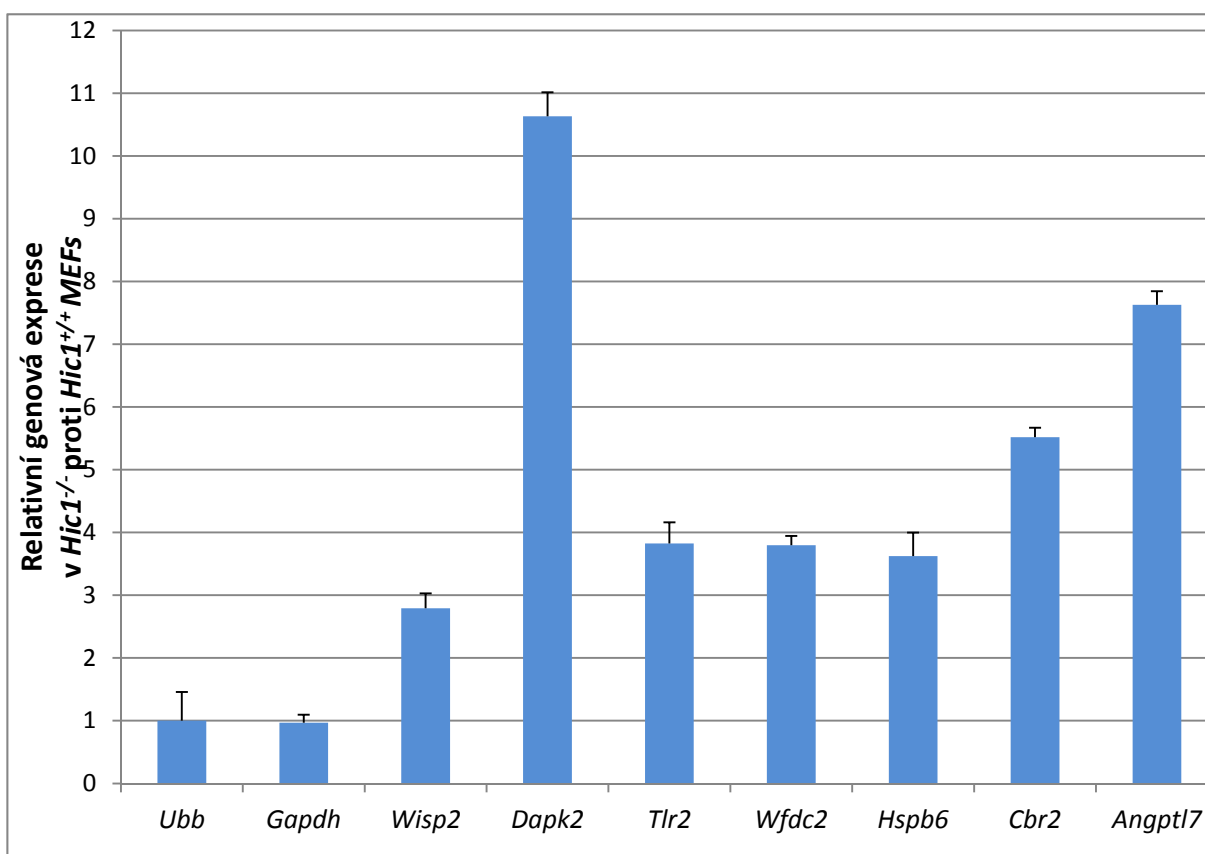
Výsledek expresní čipové analýzy potvrdil úspěšnost rekombinace „floxované“ alely *Hic1*, protože proběhlo výrazné snížení exprese *Hic1* (obr. 11; geny s poklesem exprese jsou

LIMMA analysis (contrast Mut_Wt, genes with q-value < 0.05 and FC >= 2)										
• probes write by italics has poor annotation										
ID	ENTREZ	ENSEMBL	KEGG	EC	SYMBOL	BioGPS	GENENAME	logFC	p-value	q-value
780750	15248	•			Hic1	•	hypermethylated in cancer 1	-3.37	2.6e-11	5.9e-07
6760474	213436	•			Zcchc5	•	zinc finger, CCHC domain containing 5	-1.04	2e-04	0.035
6180427	13143	•	• •	•	Dapk2	•	death-associated protein kinase 2	1.08	5.7e-07	0.0016
70601	67701	•			Wfdc2	•	WAP four-disulfide core domain 2	1.09	3e-06	0.004
2510008	230904				<i>ILMN_212537</i>	•	<i>Mus musculus F-box protein 2 (Fbxo2), mRNA.</i>	1.12	1.2e-06	0.0023
2000131	24088	•	• • • • • • • •		Tlr2	•	toll-like receptor 2	1.21	4.6e-07	0.0015
4040386	243912	•			Hspb6	•	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	1.26	5e-09	5.7e-05
6520451	654812	•			Angptl7	•	angiopoietin-like 7	1.31	2.5e-05	0.012
2490672	12409	•	• •	•	Cbr2	•	carbonyl reductase 2	1.45	7.9e-08	0.00045

Obrázek 11 Expresní čipová analýza MEFs; sloupec „logFC“ označuje relativní změnu exprese daného genu u buněk s rekombinovaným lokusem *Hic1*, srovnáno s buňkami bez rekombinace; vlastní hodnoty ve sloupci jsou vyjádřeny logaritmickou škálou (při základu log=2).

označeny modře). Zároveň bylo nalezeno sedm potencionálních nových cílových genů, jejichž exprese byla výrazně zvýšena v buňkách *Hic1*^{-/-} oproti *Hic1*^{+/+}, a to ve všech časových bodech, označeno červeně. Největší pozornost byla následně věnována genu *Tlr2* (*Toll-like receptor 2*), protože tento receptor by případně mohl hrát roli v imunitní reakci v rámci nádoru.

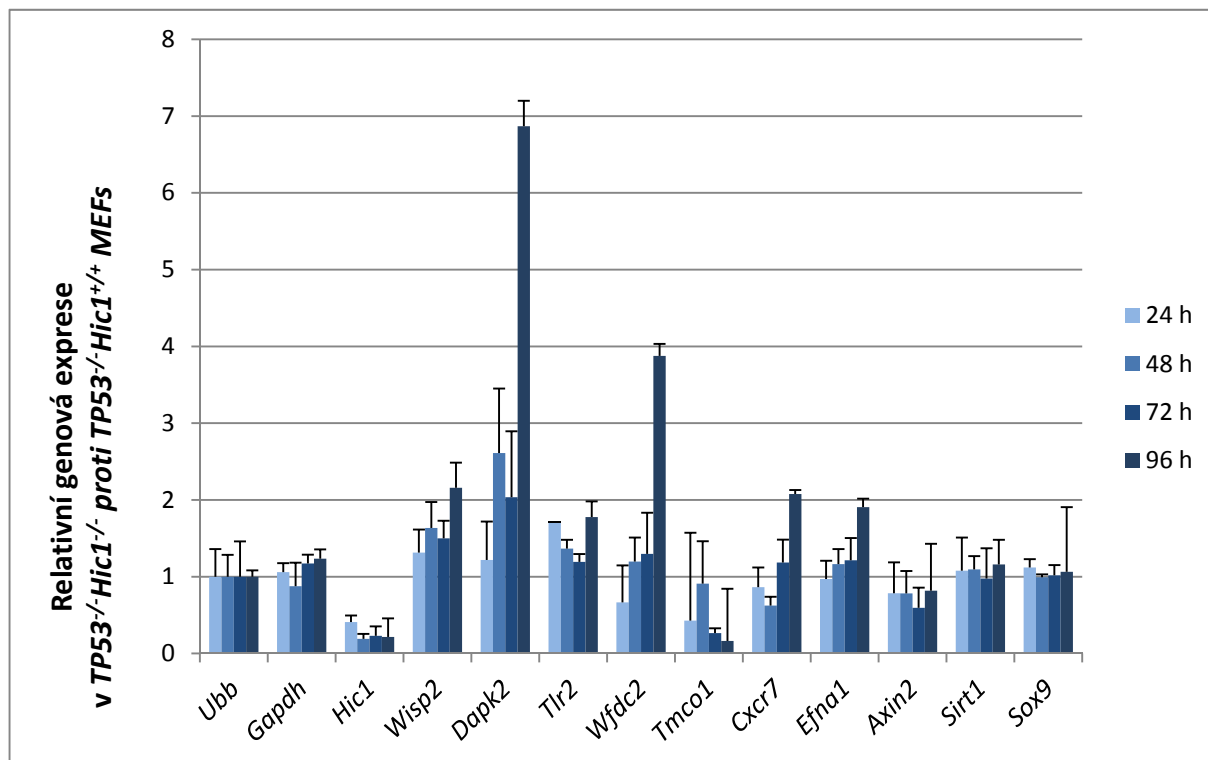
Výsledky expresní analýzy byly následně ověřeny pomocí qPCR s použitím dvou referenčních genů *Ubb* (*Ubiquitin B*) a *Gapdh* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) pro normalizaci získaných dat (obr. 12).



Obrázek 12 Relativní genová exprese (fold change) možných cílových genů *Hic1* v MEFs *Hic1*^{-/-} a *Hic1*^{+/+}; vyneseny průměrné hodnoty pro všechny časové body, v každém bodu byl proveden biologický duplikát.

Pro vyloučení případného vlivu 4-hydroxytamoxifenu na hladinu genové exprese byly provedeny analogické kontrolní experimenty. Použity byly MEFs genotypu *Hic1*^{flox/flox} a *ROSA26-CreER*^{T2+/-}.

Protože *Hic1* má úzkou vazbu na regulaci p53, byl na základě získaných dat proveden analogický experiment s myšimi embryonálními fibroblasty genotypu *Hic1^{lox/flox}-ROSA26-CreER^{T2+/-} TP53^{-/-}* (obr. 13). Z dat vyplývá, že delece *TP53* má na regulaci cílových genů *Hic1* nejednoznačný vliv.



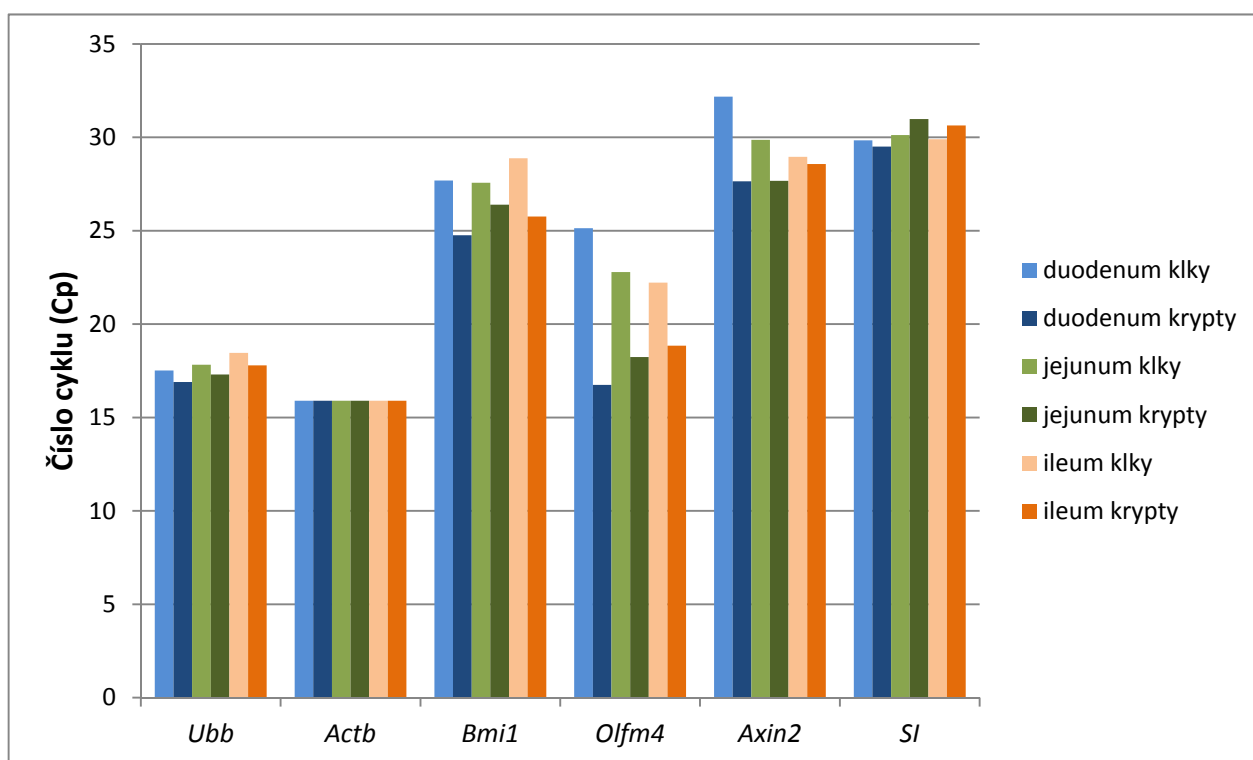
Obrázek 13 Relativní genová exprese (fold change) možných cílových genů *Hic1* v MEFs *Hic1^{-/-}* a *Hic1^{+/+}* na genetickém pozadí *TP53^{-/-}*.

Za účelem vyloučení vlivu 4-hydroxytamoxifenu na hladinu genové exprese byly opět provedeny analogické kontrolní experimenty. Použity byly MEFs genotypu *Hic1^{lox/flox}TP53^{-/-}* a *ROSA26-CreER^{T2+/-}TP53^{-/-}*.

Cílové geny *Hic1* *in vivo*

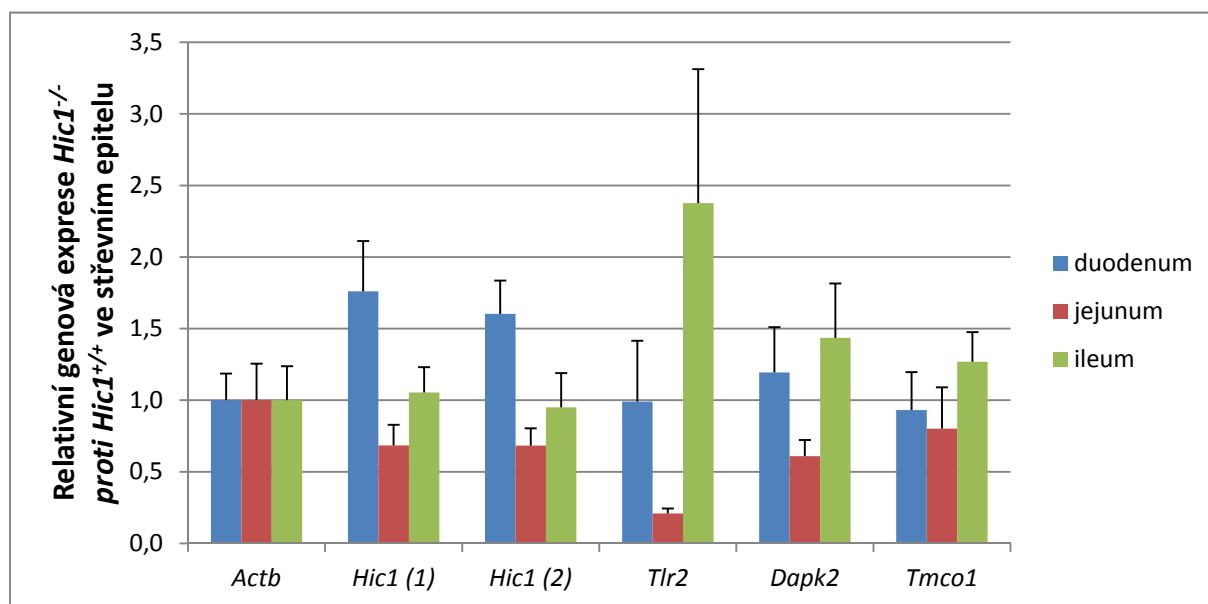
Pro sledování biologické funkce *Hic1 in vivo* bylo použito 16 myší (8 samců a 8 samic) genotypu *Hic1^{flx/flx}-Villin1-CreER^{T2+/-}*. U myší byla indukována rekombinace tamoxifenem, střevo byla odebrána 7 a 21 dní po indukci rekombinace. Střevní epitel byl odebrán z každé části střeva zvlášť (duodenum, jejunum, ileum) ve třech frakcích - klky, střední část, krypty. Celkem tedy bylo zpracováno 144 různých vzorků RNA.

Správné proběhnutí frakcionace bylo ověřeno qPCR z jedné (náhodně vybrané) myši, pro qPCR byly použity frakce krypt a klků (obr. 14). Geny *Bmi1*, *Olfm4* (*Olfactomedin 4*) a *Axin2* jsou typicky exprimovány v kryptě, zatímco *SI* (*Sucrase-Isomaltase*) je exprimován v klkové oblasti.



Obrázek 14 Genová exprese genů typických pro jednotlivé části střevního epitelu; je vyneseno číslo cyklu qPCR, kdy došlo k namnožení cDNA na hladinu detekce (angl. „Cp value“)

Vyhodnocení ukázalo, že rekombinace *Hic1* neproběhla s dostatečnou účinností tak, abychom mohli z výsledků qPCR vyvozovat jakékoli závěry, příklad výsledku je uveden na obr. 15. Důvodem nízké úspěšnosti rekombinace může být nerovnoměrná rekombinace v rámci různých segmentů střeva, rozdílnost pohlaví (tamoxifen je analogem estrogenového hormonu) a individuální „kondice“ myši.



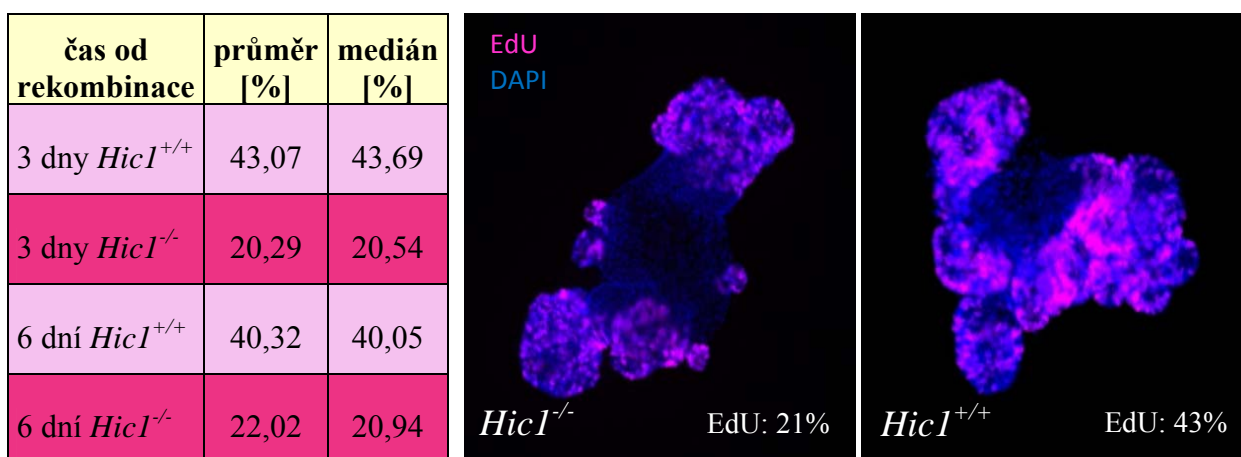
Obrázek 15 Relativní genová exprese ve střevním epitelu *Hic1*^{-/-} a *Hic1*^{+/+} myši; srovnání průměrných hodnot exprese uvedených genů zjištěných u osmi jedinců obou pohlaví po 21 dnech od indukce rekombinace tamoxifenem. Z hodnot pro *Hic1* lze usuzovat, že rekombinace nebyla účinná.

Studium funkce *Hic1* ve střevních epiteliálních organoidech

Hic1 ovlivňuje proliferaci buněk střevního epitelu

Pro sledování biologické funkce *Hic1* ve střevním epitelu byla zvolena metoda střevních organoidů, která kombinuje možnost nastavení experimentálních podmínek *in vitro* a současně udržení funkčních vztahů buněk střevního epitelu. Pro derivaci organoidů byly použity myši *Hic1^{flox/flox}-ROSA26-CreER^{T2/+}*. Následná rekombinace *in vitro* byla provedena pomocí 4-hydroxytamoxifenu neprodleně po první pasáži nebo tři dny po první pasáži. Kontrolní skupině bylo přidáno rozpouštědlo (etanol). Imunofluorescenční barvení bylo provedeno současně s proliferační analýzou EdU šest dní po první pasáži.

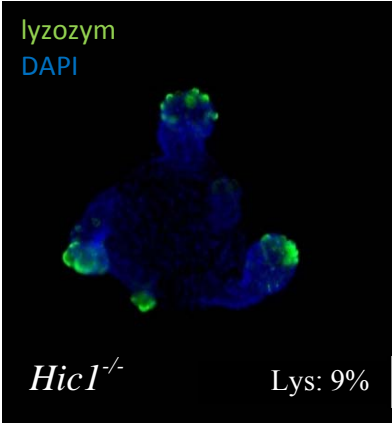
Následné měření plochy zaujímané jádry buněk (DAPI) a plochy zaujímané signálem proliferujících buněk (EdU) ukázalo, že podíl proliferujících buněk je přibližně dvakrát nižší u organoidů *Hic1^{-/-}* oproti *Hic1^{+/+}* (obr. 16). Vyhodnoceno bylo 18 organoidů (9 *Hic1^{-/-}*, 9 *Hic1^{+/+}*).



Obrázek 16 Proliferace střevních organoidů; tabulka: procentuální vyjádření plochy proliferujících buněk (EdU) vůči signálu plochy jader (DAPI). Obrázky ukazují střevní epiteliální organoidy rostoucí šest dní po první pasáži.

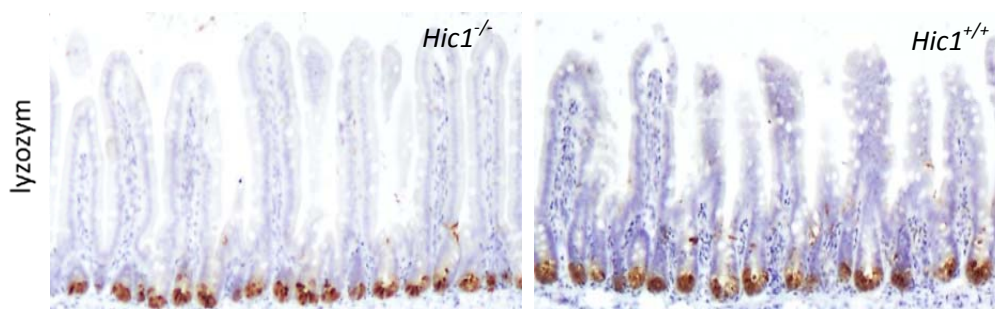
Hic1 ovlivňuje množství Panethových buněk ve střevním epitelu

Hic1 také ovlivňuje poměrné zastoupení diferencovaných typů buněk. Podíl Panethových buněk (produkující lysozym) byl určen pomocí imunofluorescence na stejných organoidech, jako měření počtu proliferujících buněk. Následně byla porovnána plocha fluorescenčního signálu lysozymu vůči signálu jader ((DAPI) obr. 17, tabulka vlevo). V organoidech *Hic1^{-/-}* je menší množství Panethových buněk než v organoidech *Hic1^{+/+}*.

čas od rekombinace	průměr [%]	medián [%]	lyzozym DAPI	
3 dny <i>Hic1</i> ^{+/+}	15,78	13,17		<i>Hic1</i> ^{-/-}
3 dny <i>Hic1</i> ^{-/-}	10,42	9,66		Lys: 9%
6 dní <i>Hic1</i> ^{+/+}	31,14	28,65		<i>Hic1</i> ^{+/+}
6 dní <i>Hic1</i> ^{-/-}	8,31	7,00		Lys: 23%

Obrázek 17 Panethovy buňky v organoidech; tabulka: procentuální vyjádření plochy zaujímané Panethovými buňkami (lyzozym) vůči signálu plochy jader (DAPI). Obrázky ukazují střevní epiteliální organoidy rostoucí šest dní po první pasáži. Barveno protilátkou proti lyzozymu.

Imunohistochemické barvení lyzozymu za účelem detekce Panethových buněk bylo následně provedeno na histologických řezech tenkým střevem myši kmenů *Hic1*^{flox/flox}-*Villin1-CreER*^{T2+/-} a *Hic1*^{flox/flox}-*Villin1-CreER*^{T2-/-} po rekombinaci, přičemž na řezech nebyl pozorován výše zmíněný rozdíl v počtu Panethových buněk (obr. 18).



Obrázek 18 Panethovy buňky na řezech tenkým střevem; mezi počtem Panethových buněk ve střevu *Hic1*^{-/-} a *Hic1*^{+/+} není pozorován rozdíl. Hnědá – protilátka proti lyzozymu. Modrá – jádra značená hematoxylinem.

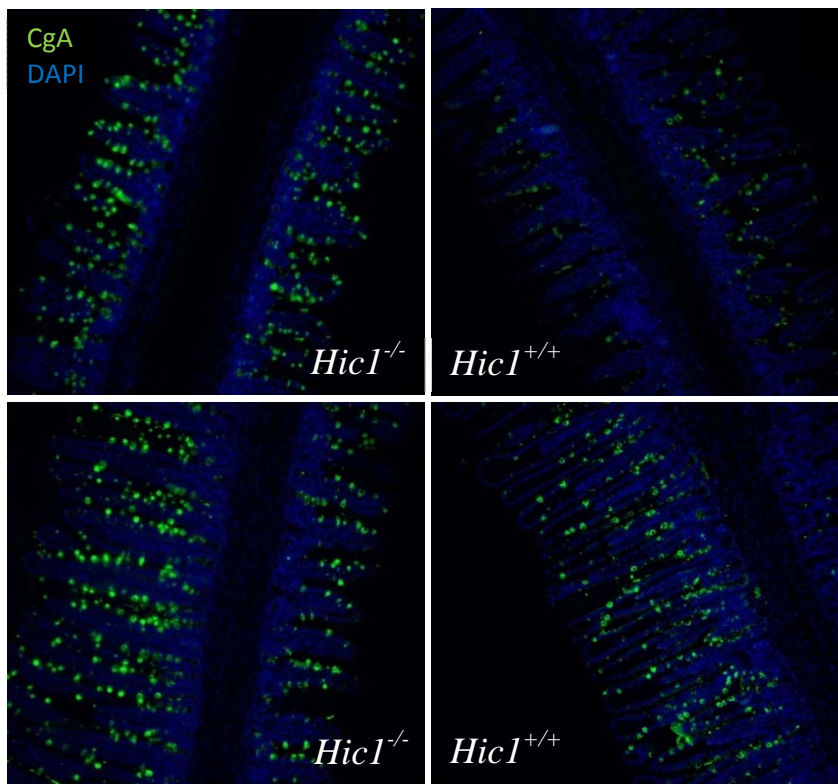
Vliv ztráty genu *Hic1* na buněčné složení střevního epitelu

Hic1 ovlivňuje množství pohárkových a enteroendokrinních buněk ve střevním epitelu

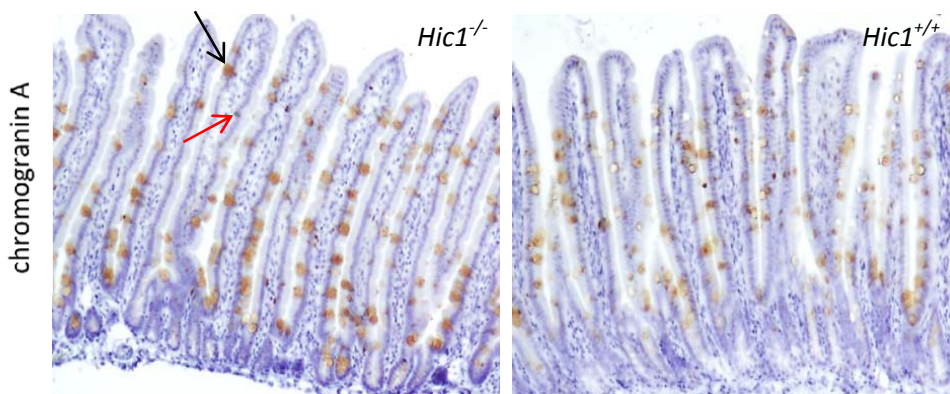
V tomto „pilotním“ pokusu byla střeva barvena imunofluorescenčně pomocí protilátky proti chromograninu A (CgA), jenž je typický pro enteroendokrinní buňky, ale současně je bohužel vyvazován na granula pohárkových buněk.

Ve střevě *Hic1*^{-/-} bylo pozorováno větší množství pohárkových a enteroendokrinních buněk, než ve střevě *Hic1*^{+/+} (obr. 19). Následně jsme se rozhodli pro přesné stanovení počtu pohárkových buněk metodou PAS (viz další kapitola)

a enteroendokrinních buněk imunohistochemicky (obr. 20). Přesné rozlišení pohárkových a enteroendokrinních buněk za účelem počítání se ukázalo jako velmi problematické, proto bylo ustoupeno od záměru počítat enteroendokrinní buňky.



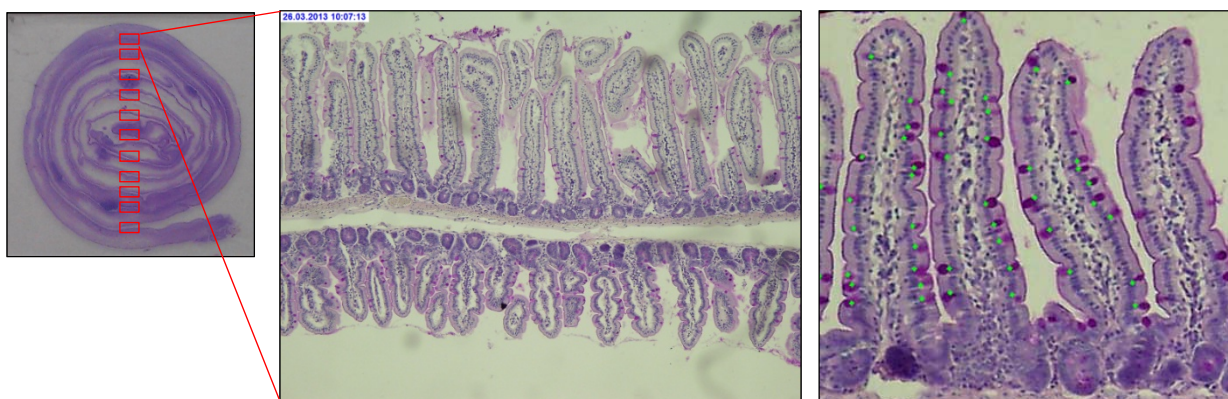
Obrázek 19 Pohárkové a enteroendokrinní buňky ve střevním epitelu; nahoře: duodenum, dole: ileum. Imunofluorescenční barvení protilátkou proti chromograninu A.



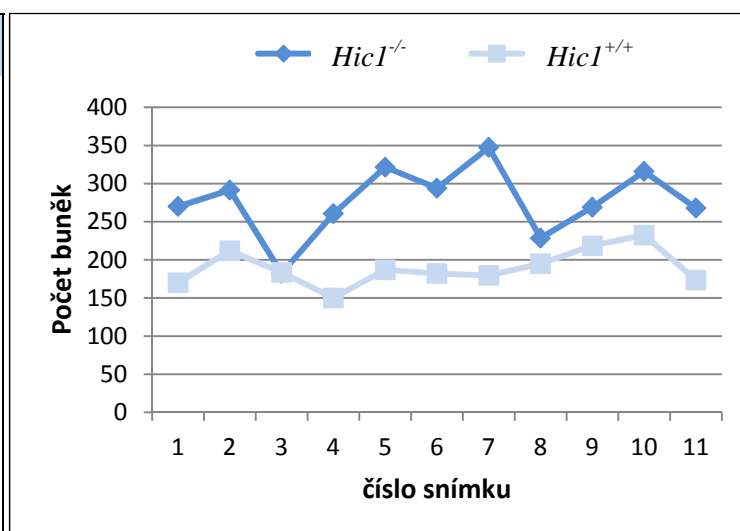
Obrázek 20 Pohárkové a enteroendokrinní buňky na řezu tenkým střevem (hnědá); modrá – jádra značená hematoxylinem. Pohárkové buňky (černá šipka) zaujímají větší plochu než enteroendokrinní buňky (červená šipka) a jsou umístěny více směrem do lumen střeva.

Protože neexistuje spolehlivá protilátka, která by dokázala značit pouze mucin v granulách pohárkových buněk, použili jsme pro detekci pohárkových buněk metodu PAS. V tomto případě jsou značena granula pohárkových i Panethových buněk, ale to není překážkou počítání, protože jejich lokalizace je ve střevě výrazně odlišná a dají se též rozlišit morfologicky.

Na obrázku 21 je naznačeno, jakým způsobem byl zjišťován počet buněk. Z každého tenkého střeva stočeného distální částí dovnitř bylo připraveno 11 snímků, viz červené rámečky (obr. 21 nahoře vlevo). Na snímcích, které mají stejné číslo, je tedy zaznamenána stejná část střeva. Na těchto snímcích (obr. 21 nahoře uprostřed) bylo v programu Ellipse spočítáno množství pohárkových buněk tak, že byl ke každé přiřazen zelený bod (obr. 21 nahoře vpravo) a body byly automaticky sečteny. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce a jejich průměrné hodnoty porovnány v grafu. Počet pohárkových buněk je ve střevě *Hic1*^{-/-} je vyšší než ve střevě *Hic1*^{+/+}.



snímek č.	<i>Hic1</i> ^{-/-} (1)	<i>Hic1</i> ^{-/-} (2)	<i>Hic1</i> ^{+/+} (3)	<i>Hic1</i> ^{+/+} (4)
1	272	268	162	178
2	298	285	245	179
3	120	245	221	146
4	322	199	179	121
5	354	289	188	186
6	254	334	195	169
7	356	339	158	201
8	165	292	154	236
9	223	315	279	158
10	370	262	225	240
11	348	188	165	182



Obrázek 21 Počítání pohárkových buněk na řezech tenkým střevem; vlevo nahoře: histologický řez celým tenkým střevem s naznačenými oblastmi využitými pro počítání. Nahoře uprostřed: příklad snímku, na kterém byly počítány pohárkové buňky. Vpravo nahoře: ke každé pohárkové buňce byl v programu Ellipse přiřazen zelený bod, body byly následně automaticky sečteny. Tabulka: výsledky počítání pohárkových buněk. Graf: vyneseny jsou průměrné hodnoty, ve střevě genotypu *Hic1*^{-/-} je větší množství pohárkových buněk než ve střevě *Hic1*^{+/+}.

Diskuze

U genů, jež byly výše v literárním přehledu uvedeny jako cílové geny *Hic1*, nebyl v provedené expresní čipové analýze pozorován výrazný rozdíl mezi expresí v MEFs *Hic1*^{-/-} oproti *Hic1*^{+/+}, což může být způsobeno metodou jejich objevu. Ve všech případech byly tyto geny shledány cílovými geny *Hic1* po transfekci a následné nadprodukci *Hic1* v buňkách *in vitro*, což nutně nemusí odpovídat situaci v buňce s endogenní expresí *Hic1*.

Ověření cílových genů *in vivo* se jevilo jako problematické z důvodu nerovnoměrné míry úspěšnosti rekombinace tamoxifenem regulované *Cre* v jednotlivých částech střeva. *Hic1* nebyl plošně vyřazen, proto tyto výsledky nemohou být považovány za absolutně spolehlivé. Jako řešení tohoto metodického problému se nabízí použití konstitutivně aktivní *Cre* v lokusu *Villin1* na místo použité tamoxifenem regulované *CreER*^{T2}, čímž bude vyloučen vliv nerovnoměrné distribuce tamoxifenu v organismu. Provedení experimentu může zůstat stejné, protože izolace epitelu podél krypto-klkové osy úspěšně funguje.

V experimentu sledujícím hladinu exprese cílových genů *Hic1* při současné podmíněné deleci *Hic1* a *TP53* nebylo zjištěno předpokládané kumulativní zvýšení exprese cílových genů *Hic1*. Při srovnání Cp *Hic1* a potencionálních cílových genů *Hic1* v MEFs *Hic1*^{+/+} *TP53*^{+/+} a *Hic1*^{+/+} *TP53*^{-/-} nebyl patrný rozdíl mezi vzorky, nefunkčnost lokusu *TP53* patrně nemá výrazný vliv na expresi *Hic1* ani na expresi cílových genů *Hic1*. Příčinou může být složitost buněčné odpovědi zajišťované regulační smyčkou *Hic1*-*Sirt1*-*p53*.

Střevní epiteliální organoidy vykazují při vyřazení genu *Hic1* sníženou schopnost proliferace, což je překvapivé, protože *Hic1* je negativním regulátorem signální dráhy Wnt a očekávaný efekt byl proto opačný. Situace ve střevním organoidu může být ve srovnání se situací v organismu ovlivněna absencí mezenchymálních buněk, které jsou ve střevě v přímém kontaktu s epiteliálními buňkami. Obdobné případy odlišného chování organoidů a střevního epitelu *in vivo* již byly zdokumentovány v případě negativního regulátoru signalizace Wnt, genu *Troy* (Faflek et al., 2012) a ligandu signalizace Wnt, genu *Wnt3* (Farin et al., 2012). Stejnou příčinu můžeme nacházet pro snížené množství Panethových buněk v organoidech *Hic1*^{-/-}, protože ve střevě je předpokládána negativní regulace *Atoh1* pomocí *Hic1* a vyřazení genu *Hic1* by se mělo projevit zvýšeným poměrem sekretorních buněk oproti enterocytům. Mezi množstvím Panethových buněk na histologických řezech střeva genotypů *Hic1*^{-/-} a *Hic1*^{+/+} nebyl pozorován rozdíl. Získaná data nebyla kvantitativně analyzována, protože z důvodu umístění Panethových buněk ve tkáni by jejich počítání bylo velmi nepřesné.

Byl pozorován výrazný vliv vyřazení *Hic1* na zastoupení pohárkových buněk ve střevním epitelu. Předpokládaným mechanismem zvýšení počtu pohárkových buněk ve střevě *Hic1*^{-/-} je regulace sekreční dráhy diferenciace střevních epiteliálních buněk genem *Atoh1*. Ověření vlivu *Hic1* na expresi *Atoh1* se nepodařilo zdokumentovat z důvodu nerovnoměrné míry úspěšnosti rekombinace tamoxifenem regulované Cre v jednotlivých částech střeva. Pro potvrzení tohoto vlivu bude proveden analogický experiment, ale za použití konstitutivně aktivní Cre. Vliv *Hic1* na počet enteroendokrinních buněk se nepodařilo ověřit, protože neexistuje protilátka ani jiná histologická metoda, kterou by je bylo možné jednoznačně detekovat.

Závěr

Nádorový supresorový gen *HIC1* funguje jako negativní modulátor signalizace Wnt, evolučně konzervované signální kaskády, uplatňující se v zárodečném vývoji organismu a v dospělosti při sebeobnově tkání, např. střevního epitelu. Je také transkripčním represorem, jehož cílové geny jsou z větší části neznámé. Ve velkém množství nádorů různých tkání bývá *HIC1* inaktivován pomocí hypermetylace svého promotoru. Protože celkový „knock-out“ způsobuje smrt zárodku, byla pro výzkum biologické funkce myšního *Hic1* zvolena metoda podmíněné delece v dospělém organismu.

Zjištění cílových genů *Hic1* v podmínkách *in vitro* byla provedena expresní čipová analýza MEFs, po vyřazení *Hic1*, přičemž nejzajímavějším cílovým genem se jevil gen kódující *Toll-like receptor 2*. Přestože je známo, že *Hic1* interaguje s p53, v analogickém experimentu s využitím MEFs s nefunkčním p53 vliv p53 na expresi *Hic1* ani cílových genů *Hic1* nebyl pozorován. Výsledek vyhledávání cílových genů *Hic1* v živé tkáni nemá vypovídající hodnotu, protože podmíněná delece *Hic1* ve střevním epitelu nebyla dostatečně účinná.

Vliv *Hic1* na proliferaci střevního epitelu byl zjišťován ve střevních epiteliálních organoidech. Z kvantitativní analýzy vyplynulo, že epitel po deleci *Hic1* vykazuje sníženou schopnost proliferace oproti organoidům s funkčním *Hic1*. Dále bylo zjištěno, že organoidy genotypu *Hic1*^{-/-} obsahují menší množství Panethových buněk než organoidy *Hic1*^{+/+}. Tento fenotyp ale nebyl pozorován *in vivo*.

Ve střevním epitelu po podmíněné deleci *Hic1* bylo pozorováno zvýšené množství pohárkových buněk oproti epitelu s funkčním genem *Hic1*. Kvantitativní analýza tento jev potvrdila. Zjištění počtu enteroendokrinních buněk ve střevním epitelu nebylo provedeno z důvodu nedostupnosti metody, která by umožnila jednoznačnou detekci enteroendokrinních buněk v histologickém řezu střevní tkání.

Literatura

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797-3804.
- Arai, E., and Kanai, Y. (2010). DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. *Epigenomics* 2, 467-481.
- Barker, N., and Clevers, H. (2010). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* 138, 1681-1696.
- Bartscherer, K., and Boutros, M. (2008). Regulation of Wnt protein secretion and its role in gradient formation. *EMBO Rep* 9, 977-982.
- Baylin, S.B., and Ohm, J.E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6, 107-116.
- Boulay, G., Malaquin, N., Loison, I., Foveau, B., Van Rechem, C., Rood, B.R., Pourtier, A., and Leprince, D. (2012). Loss of Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1) in breast cancer cells contributes to stress-induced migration and invasion through β -2 adrenergic receptor (ADRB2) misregulation. *J Biol Chem* 287, 5379-5389.
- Briggs, K.J., Corcoran-Schwartz, I.M., Zhang, W., Harcke, T., Devereux, W.L., Baylin, S.B., Eberhart, C.G., and Watkins, D.N. (2008). Cooperation between the Hic1 and Ptc1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev* 22, 770-785.
- Briones, V.R., Chen, S., Riegel, A.T., and Lechleider, R.J. (2006). Mechanism of fibroblast growth factor-binding protein 1 repression by TGF-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 595-601.
- Britschgi, C., Jenal, M., Rizzi, M., Mueller, B.U., Torbett, B.E., Andres, A.C., Tobler, A., Fey, M.F., and Tschan, M.P. (2008). HIC1 tumour suppressor gene is suppressed in acute myeloid leukaemia and induced during granulocytic differentiation. *Br J Haematol* 141, 179-187.
- Britschgi, C., Rizzi, M., Grob, T.J., Tschan, M.P., Hügli, B., Reddy, V.A., Andres, A.C., Torbett, B.E., Tobler, A., and Fey, M.F. (2006). Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1. *Oncogene* 25, 2030-2039.
- Carter, M.G., Johns, M.A., Zeng, X., Zhou, L., Zink, M.C., Mankowski, J.L., Donovan, D.M., and Baylin, S.B. (2000). Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene Hic1 exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 9, 413-419.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.
- Cornelis, R.S., van Vliet, M., Vos, C.B., Cleton-Jansen, A.M., van de Vijver, M.J., Peterse, J.L., Khan, P.M., Børresen, A.L., Cornelisse, C.J., and Devilee, P. (1994). Evidence for a gene on 17p13.3, distal to TP53, as a target for allele loss in breast tumors without p53 mutations. *Cancer Res* 54, 4200-4206.
- Dehennaut, V., and Leprince, D. (2009). Implication of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) in the DNA damage response. *Bull Cancer* 96, E66-72.
- Deltour, S., Guerardel, C., and Leprince, D. (1999). Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and gammaFBP-B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14831-14836.
- Denis, H., Ndlovu, M.N., and Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep* 12, 647-656.
- Dignass, A.U., and Sturm, A. (2001). Peptide growth factors in the intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13, 763-770.
- el Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39, 186-193.
- Evans, G.S., Flint, N., Somers, A.S., Eyden, B., and Potten, C.S. (1992). The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci* 101 (Pt 1), 219-231.

Fafilek, B., Krausova, M., Vojtechova, M., Pospichalova, V., Tumova, L., Sloncova, E., Huranova, M., Stancikova, J., Hlavata, A., Svec, J., *et al.* (2012). Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, Interacts With Lgr5 to Inhibit Wnt Signaling in Intestinal Stem Cells. *Gastroenterology*.

Farin, H.F., Van Es, J.H., and Clevers, H. (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* 143, 1518-1529 e1517.

Fleurbaey, C., Touka, M., Boulay, G., Guérardel, C., Rood, B.R., and Leprince, D. (2009). HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 26-33.

Foveau, B., Boulay, G., Pinte, S., Van Rechem, C., Rood, B.R., and Leprince, D. (2012). The receptor tyrosine kinase EphA2 is a direct target gene of hypermethylated in cancer 1 (HIC1). *J Biol Chem* 287, 5366-5378.

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435, 964-968.

Fukumachi, H. (1992). Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture. *J Cell Sci* 103 (Pt 2), 511-519.

Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., and Stratton, M.R. (2004). A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4, 177-183.

Gao, C., and Chen, Y.G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22, 717-727.

Gerbe, F., van Es, J.H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N.F., Bourgaux, J.F., Pignodel, C., *et al.* (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* 192, 767-780.

Gramlich, T., and Petras, R.E. (2007). Pathology of inflammatory bowel disease. *Semin Pediatr Surg* 16, 154-163.

Grimm, C., Spörle, R., Schmid, T.E., Adler, I.D., Adamski, J., Schughart, K., and Graw, J. (1999). Isolation and embryonic expression of the novel mouse gene Hic1, the homologue of HIC1, a candidate gene for the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 8, 697-710.

Haramis, A.P., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J., and Clevers, H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303, 1684-1686.

Henderson, B.R., and Fagotto, F. (2002). The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep* 3, 834-839.

Chen, W., Cooper, T.K., Zahnow, C.A., Overholtzer, M., Zhao, Z., Ladanyi, M., Karp, J.E., Gokgoz, N., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., *et al.* (2004). Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* 6, 387-398.

Chen, W.Y., Wang, D.H., Yen, R.C., Luo, J., Gu, W., and Baylin, S.B. (2005). Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123, 437-448.

Chen, W.Y., Zeng, X., Carter, M.G., Morrell, C.N., Chiu Yen, R.W., Esteller, M., Watkins, D.N., Herman, J.G., Mankowski, J.L., and Baylin, S.B. (2003). Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* 33, 197-202.

Iaquinta, P.J., and Lees, J.A. (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 19, 649-657.

Jenal, M., Trinh, E., Britschgi, C., Britschgi, A., Roh, V., Vorburger, S.A., Tobler, A., Leprince, D., Fey, M.F., Helin, K., *et al.* (2009). The tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1 is transcriptionally regulated by E2F1. *Mol Cancer Res* 7, 916-922.

Kanwal, R., and Gupta, S. (2012). Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet* 81, 303-311.

Karpowicz, P., and Perrimon, N. (2010). All for one, and one for all: the clonality of the intestinal stem cell niche. *F1000 Biol Rep* 2, 73.

Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627-2634.

Kilinc, D., Ozdemir, O., Ozdemir, S., Korgali, E., Koksall, B., Uslu, A., and Gultekin, Y.E. (2012). Alterations in promoter methylation status of tumor suppressor HIC1, SFRP2, and DAPK1 genes in prostate carcinomas. *DNA Cell Biol* 31, 826-832.

Kim, K.A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., *et al.* (2005). Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 309, 1256-1259.

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19, 379-383.

Kraehenbuhl, J.P., and Neutra, M.R. (2000). Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 301-332.

Kühn, R., and Torres, R.M. (2002). Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol Biol* 180, 175-204.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26.

Mii, Y., and Taira, M. (2011). Secreted Wnt "inhibitors" are not just inhibitors: regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. *Dev Growth Differ* 53, 911-923.

Mohammad, H.P., Zhang, W., Prevas, H.S., Leadem, B.R., Zhang, M., Herman, J.G., Hooker, C.M., Watkins, D.N., Karim, B., Huso, D.L., *et al.* (2011). Loss of a single Hic1 allele accelerates polyp formation in Apc(Δ 716) mice. *Oncogene* 30, 2659-2669.

Parrella, P., Scintu, M., Prencipe, M., Poeta, M.L., Gallo, A.P., Rabitti, C., Rinaldi, M., Tommasi, S., Paradiso, A., Schittulli, F., *et al.* (2005). HIC1 promoter methylation and 17p13.3 allelic loss in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Lett* 222, 75-81.

Pehlivan, S., Artac, M., Sever, T., Bozcuk, H., Kilincarslan, C., and Pehlivan, M. (2010). Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 201, 128-132.

Perreault, N., and Beaulieu, J.F. (1996). Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 224, 354-364.

Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Rood, B.R., Guérardel, C., and Leprince, D. (2004). The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. *J Biol Chem* 279, 38313-38324.

Pospichalova, V., Tureckova, J., Fafilek, B., Vojtechova, M., Krausova, M., Lukas, J., Sloncova, E., Takacova, S., Divoky, V., Leprince, D., *et al.* (2011). Generation of two modified mouse alleles of the Hic1 tumor suppressor gene. *Genesis* 49, 142-151.

Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.

Rodier, F., Campisi, J., and Bhaumik, D. (2007). Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* 35, 7475-7484.

Rood, B.R., Zhang, H., Weitman, D.M., and Cogen, P.H. (2002). Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma. *Cancer Res* 62, 3794-3797.

Sasaki, T., Giltay, R., Talts, U., Timpl, R., and Talts, J.F. (2002). Expression and distribution of laminin alpha1 and alpha2 chains in embryonic and adult mouse tissues: an immunochemical approach. *Exp Cell Res* 275, 185-199.

Sato, T., and Clevers, H. (2013). Primary mouse small intestinal epithelial cell cultures. *Methods Mol Biol* 945, 319-328.

Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415-418.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., *et al.* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.

Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14, 381-392.

Shroyer, N.F., Helmrath, M.A., Wang, V.Y., Antalffy, B., Henning, S.J., and Zoghbi, H.Y. (2007). Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology* 132, 2478-2488.

Sidransky, D., and Hollstein, M. (1996). Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med* 47, 285-301.

Snippert, H.J., van der Flier, L.G., Sato, T., van Es, J.H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A.M., van Rheenen, J., Simons, B.D., *et al.* (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 143, 134-144.

Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guérardel, C., Dejean, A., and Leprince, D. (2007). An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* 27, 2661-2675.

Stöcklein, H., Smardova, J., Macak, J., Katzenberger, T., Höller, S., Wessendorf, S., Hutter, G., Dreyling, M., Haralambieva, E., Mäder, U., *et al.* (2008). Detailed mapping of chromosome 17p deletions reveals HIC1 as a novel tumor suppressor gene candidate telomeric to TP53 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 27, 2613-2625.

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., and de Sauvage, F.J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478, 255-259.

Tseng, R.C., Lee, C.C., Hsu, H.S., Tzao, C., and Wang, Y.C. (2009). Distinct HIC1-SIRT1-p53 loop deregulation in lung squamous carcinoma and adenocarcinoma patients. *Neoplasia* 11, 763-770.

Valenta, T., Lukas, J., Doubravska, L., Fafulek, B., and Korinek, V. (2006). HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *EMBO J* 25, 2326-2337.

van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71, 241-260.

Van Rechem, C., Boulay, G., Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Guérardel, C., and Leprince, D. (2010). Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD, via an acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells. *Mol Cell Biol* 30, 4045-4059.

Van Rechem, C., Rood, B.R., Touka, M., Pinte, S., Jenal, M., Guérardel, C., Ramsey, K., Monté, D., Bégue, A., Tschan, M.P., *et al.* (2009). Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *J Biol Chem* 284, 20927-20935.

VanDussen, K.L., and Samuelson, L.C. (2010). Mouse atonal homolog 1 directs intestinal progenitors to secretory cell rather than absorptive cell fate. *Dev Biol* 346, 215-223.

Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5, 367-377.

Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., and Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661-665.

Vincent, J.P., and Beckett, K. (2011). Off-track takes Frizzled off the canonical path. *EMBO J* 30, 3665-3666.

Wales, M.M., Biel, M.A., el Deiry, W., Nelkin, B.D., Issa, J.P., Cavenee, W.K., Kuerbitz, S.J., and Baylin, S.B. (1995). p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1, 570-577.

Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., and DiNardo, S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wntless signalling. *Nature* 407, 527-530.

Yan, K.S., Chia, L.A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J.Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S.C., Amieva, M.R., *et al.* (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 466-471.

Yingling, J., Toyo-Oka, K., and Wynshaw-Boris, A. (2003). Miller-Dieker syndrome: analysis of a human contiguous gene syndrome in the mouse. *Am J Hum Genet* 73, 475-488.

Zhang, B., Chambers, K.J., Leprince, D., Faller, D.V., and Wang, S. (2009). Requirement for chromatin-remodeling complex in novel tumor suppressor HIC1-mediated transcriptional repression and growth control. *Oncogene* 28, 651-661.

Zhang, W., Zeng, X., Briggs, K.J., Beaty, R., Simons, B., Chiu Yen, R.W., Tyler, M.A., Tsai, H.C., Ye, Y., Gesell, G.S., *et al.* (2010). A potential tumor suppressor role for Hic1 in breast cancer through transcriptional repression of ephrin-A1. *Oncogene* 29, 2467-2476.